





معاونت پژوهش و فن آوری

به نام خدا

منشور اخلاق پژوهش

یاری از خداوند سبحان و اعتماد به این که عالم حاضر خداست و همواره مانع بر احوال انسان در مسیر پاس داشتن مقام بلند دانش و پژوهش و تفکر به ایت جایگاه دانشگاه و انشعای فرهنگ و تمدن بشری، با دانشمندان و اصنام هدایت علمی

و اصدای دانشگاه آزاد اسلامی مشهد می‌گردیم اصول زیر را در انجام فعالیت‌های پژوهشی به نظر قرار داده و از آن تعقیب می‌کنیم:

۱- اصل حقیقت‌جویی: تلاش در راستای پی‌جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از حرکت به پنهان‌سازی حقیقت.

۲- اصل رعایت حقوق: التزام به رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پژوهشگران (انسان، حیوان و نبات) و سایر مساجان حق.

۳- اصل مالکیت مادی و معنوی: تعهد به رعایت کامل حقوق مادی و معنوی دانشگاه و کلیه همکاران پژوهش.

۴- اصل منافع ملی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن به‌شیر و توسعه کشور و کلیه مراحل پژوهش.

۵- اصل رعایت انصاف و امانت: تعهد به اجتناب از حرکت به جانب داری غیر علمی و حفاظت از اموال، تجهیزات و منابع در اختیار.

۶- اصل رازداری: تعهد به صیانت از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد سازمان و کشور و کلیه افراد و نهادی مرتبط با تحقیق.

۷- اصل احترام: تعهد به رعایت حریم با حرمت با دیگران و انجام تحقیقات و رعایت جانب‌داری و خودداری از حرکت به حرمت شکنی.

۸- اصل ترویج: تعهد به رواج دانش و ابداع نتایج تحقیقات و انتقال آن به همکاران علمی و دانشمندان به غیر از مواردی که منع قانونی دارد.

۹- اصل برکت: التزام به برکت‌جویی از حرکت به رفتار غیر حرفه‌ای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به مثابه‌ای غیر علمی می‌آیند.



تعهدنامه اصالت رساله یا پایان نامه

اینجانب محمود سینایی دانش آموخته مقطع دکتری تخصصی / در رشته بیولوژی دریا که در تاریخ از پایان نامه / رساله خود تحت عنوان " مطالعه بیوژئوشیمیایی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs) و تاثیر آن بر فاکتور های فیزیولوژیک ماهی گل خورک گونه (B. dussumieri) در سواحل خوزستان" با کسب نمره و درجه دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می شوم:

۱) این پایان نامه / رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و ...) استفاده نموده ام، مطابق ضوابط و رویه موجود، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده ام.

۲) این پایان نامه / رساله قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح، پائین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاه ها و مؤسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

۳) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان نامه داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

۴) چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی:

محمود سینایی

تاریخ و امضاء:



دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم و تحقیقات
دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه بیولوژی دریا

رساله دکتری رشته بیولوژی دریا (Ph.D)

عنوان

مطالعه بیوژئوشیمیایی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs) و تاثیر آن بر فاکتور های فیزیولوژیک ماهی گل خورک گونه (*B. dussumieri*) در سواحل خوزستان

استادان راهنما

دکتر پیمان اقتصادی عراقی
دکتر علی ماشینچیان

استادان مشاور

دکتر محمد رضا فاطمی
دکتر غلامحسین ریاضی

نگارش

محمود سینایی

تابستان ۹۲

من لم یسکر المخلوق لم یسکر الخالق....

نمی توانم معنایی بالاتر از تقدیر و شکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف استادان خویش آشکار نمایم، که هر چه گویم و سرایم، کم گفته ام. بر خود لازم می دانم از زحمات اساتید راهنمای کرامتقدر خود جناب آقای دکتر پیمان اقتصادی عراقی و جناب آقای دکتر علی ماشینیان و اساتید مشاور گرانمایه جناب آقای دکتر محمد رضا فاطمی و جناب آقای دکتر غلامحسین ریاضی کمال شکر و قدردانی را ابراز نمایم.

از زحمات اساتید عزیز در دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران کمال شکر و امتنان را دارم.

از مسئولین محترم مؤسسه ملی اقیانوسی شناسی به دلیل حمایت مالی و معنوی از مراحل اجرایی این رساله کمال شکر و قدردانی را دارم.

از زحمات بی دریغ سرکار خانم مهندس رحمان پور کارشناس مرکز مؤسسه ملی اقیانوس شناسی کمال شکر و قدردانی را دارم.

زحمات بی شائبه و دلوزانه دوستان عزیزم آقایان مهندس کاظم دویش بطامی، مهندس شهبانی، مهندس اسدی، مهندس صحرایان، مهندس هاشمی، مهندس قدمگاهی، مهندس شکاری، مهندس ادکی پور، دکتر ناطقی، دکتر خوشنود در راستای همکاری با اینجانب در حبل انجام این رساله ارج می نهم و صمیمانه ترین آرزوها را برای ایشان از خداوند منان خواستارم.

تقدیم به پدرم

پدرم راه تمام زندگیست

پدرم دنجوشی، همیشگی ست

پدرم، خورشیدی شدی و از روشنائی ات جان گرفتیم و در ناامیدی مانازم را کشیدی و لبریزم کردی از شوق
اکنون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد، به خودم تبریک می گویم که تو را دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو را ندارد.....

تقدیم به مادرم

تو ای مادر، ای شوق زیبای نفس کشیدن

ای روح مهربان، هستی ام

تو رنگ شادی هایم شدی و عمری خشکی ما را به جان خریدی تا اکنون توانستی طعم خوش پیروزی را به من بچشانی.

تقدیم به همسرم

که سایه مهربانش سایه ساز زندگی من می باشد، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود.

تقدیم به پسرم شایان

برای شاپرک های باغچه ی خانه ی دلت دعا می کنم که بال هایشان هرگز محتاج مرهم نباشند.

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
چکیده.....	۱
.....	۲

فصل اول: کلیات تحقیق

۱-۱	مقدمه.....	۴
۲-۱	خلیج فارس.....	۶
۳-۱	هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای.....	۸
۱-۳-۱	شیمی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای.....	۹
۲-۳-۱	هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در اکوسیستم های آبی.....	۱۲

فصل دوم: مروری بر ادبیات تحقیق و پیشینه تحقیق

۱-۲	سمیت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای:.....	۱۵
۱-۱-۲	مکانیسم سمیت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای:.....	۱۶
۲-۲	متابولیسم هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای.....	۱۸
۱-۲-۲	آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز.....	۲۱
۳-۲	لیزوزوم.....	۲۲
۱-۳-۲	نقش های لیزوزوم.....	۲۲
۲-۳-۲	آنزیم های لیزوزومی.....	۲۳
۳-۳-۲	ساختار غشاء لیزوزوم.....	۲۳
۴-۳-۲	عوامل تاثیر گذار و مخرب غشاء لیزوزوم.....	۲۴
۵-۳-۲	تغییرات غشاء لیزوزوم به عنوان نشانگر زیستی.....	۲۵
۴-۲	سلول گلبول قرمز خون.....	۲۶
۱-۴-۲	ساختار غشاء سلول گلبول قرمز.....	۲۶

۲۸	۲-۴-۲ تغییرات غشاء گلبول قرمز به عنوان نشانگر زیستی.....
۲۹	۵-۲ معرفی گونه.....
۳۱	۲-۵-۱ طبقه بندی گونه <i>Boleophthalmus dussumieri</i>
۳۲	۲-۵-۲ مورفولوژی.....
۳۲	۲-۵-۳ پراکنش جهانی.....
۳۳	۲-۵-۴ پراکنش منطقه ای.....
۳۳	۲-۵-۵ تغذیه.....
۳۳	۲-۵-۶ تولید مثل.....
۳۳	۲-۶ پیشینه تحقیق در ایران و جهان.....

فصل سوم: روش اجرای تحقیق

۳۸	۳-۱ محل و زمان انجام تحقیق.....
۳۹	۳-۲ مواد و وسایل.....
۳۹	۳-۲-۱ مواد و وسایل مصرفی.....
۳۹	۳-۲-۲ مواد و وسایل غیر مصرفی.....
۴۰	۳-۳ گونه مورد آزمایش.....
۴۰	۳-۴ مراحل اجرایی.....
۴۰	۳-۴-۱ عملیات میدانی.....
۴۰	۳-۴-۲ عملیات آزمایشگاهی.....
۴۳	۳-۵ آنالیز هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای.....
۴۳	۳-۵-۱ شستشوی ظروف.....
۴۳	۳-۵-۲ استخراج هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های بافت ماهی.....
۴۴	۳-۵-۳ استخراج هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب.....
۴۵	۳-۵-۴ استخراج هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های آب.....
۴۵	۳-۵-۵ سنجش ترکیبات استخراج هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای.....
۴۷	۳-۶ سنجش آنزیم گلوکاتیون اس ترانسفراز.....

۷-۳	آنالیز میزان تغییرات غشاء لیزوزوم توسط روش NRR time.	۴۸
۸-۳	آنالیز میزان پایداری غشاء گلبول قرمز با استفاده از روش EOF	۵۰
۹-۳	قرار گیری گلبول قرمز در معرض ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در شرایط آزمایشگاهی	۵۲
۱-۹-۳	محلول های مورد نیاز آزمایش	۵۲
۲-۹-۳	تهیه غلظت های آلاینده	۵۲
۳-۹-۳	جداسازی گلبول قرمز	۵۴
۴-۹-۳	قرار گیری گلبول قرمز در معرض ترکیبات مختلف آلاینده	۵۴
۵-۹-۳	سنجش تغییرات پایداری غشاء گلبول قرمز	۵۴
۱۰-۳	روش های آماری و نرم افزار های مورد استفاده	۵۴

فصل چهارم: تجزیه و تحلیل داده ها

۴	نتایج	۵۶
۱-۴	میزان تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد	۵۷
۲-۴	میزان تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت آبشش	۵۷
۳-۴	میزان تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب	۵۹
۴-۴	میزان تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های آب	۵۹
۵-۴	الگوی پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای	۶۱
۶-۴	تعیین منبع آلودگی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای	۶۲
۷-۴	شاخص های بیولوژیک	۶۳
۸-۴	فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز	۶۴
۹-۴	نتایج NRR time	۶۵
۱۰-۴	نتایج تست EOF	۶۶
۱۱-۴	رابطه بین تجمع هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و نشانگر های زیستی	۶۸
۱۲-۴	نتایج قرار گیری گلبول قرمز ماهی گل خورک در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای	۶۹

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات

۵ بحث و نتیجه گیری.....	۷۹
۵-۱ غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های زیستی (بافت کبد و آبشش).....	۷۹
۵-۲ غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های غیر زیستی (رسوب و آب).....	۸۴
۵-۳ منبع آلودگی	۸۹
۵-۴ شاخص های بیولوژیک.....	۸۹
۵-۵ پاسخ های فیزیولوژیک ماهی گل خورک به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای.....	۹۰
۵-۵-۱ فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز.....	۹۰
۵-۵-۲ میزان تغییرات غشاء لیزوزوم (تست NRR time).....	۹۳
۵-۵-۳ تست پایداری غشاء سلول گلبول قرمز خون.....	۹۵
۵-۵-۴ قرار گیری گلبول قرمز خون ماهی در معرض ترکیبات مختلف هیدروکربن های	
آروماتیک چند حلقه ای.....	۹۶
۵-۶ ارزیابی پاسخ های فیزیولوژیک مورد بررسی به عنوان بیومارکر ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند	
حلقه ای.....	۱۰۱
۵-۷ نتیجه گیری.....	۱۰۴
۵-۸ پیشنهادات.....	۱۰۵
فهرست منابع فارسی.....	۱۰۶
فهرست منابع انگلیسی.....	۱۰۶
چکیده انگلیسی.....	۱۱۸
.....	۱۱۹

فهرست جداول

عنوان

شماره صفحه

جدول ۱-۳-۱ میزان تخلیه سالانه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به اتمسفر و محیط های آبی.....	۹
جدول ۱-۳-۲ ویژگی های فیزیکی و شیمیایی ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای....	۱۰
.....	۱۱
جدول ۳-۱-۳ موقعیت ایستگاههای نمونه برداری در شمال غرب خلیج فارس.....	۳۹
جدول ۳-۷-۴ نمونه جدول استفاده شده در آزمایش NRR time.....	۴۹
جدول ۳-۸-۵ تهیه غلظت های مورد نظر جهت انجام آزمایش.....	۵۱
جدول ۳-۹-۶ غلظت های مختلف ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مورد استفاده.....	۵۳
جدول ۴-۷ ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای سنجش شده.....	۵۶
جدول ۴-۸-۱ مقادیر سنجش شده (میانگین \pm انحراف معیار) ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد ($ng\ g^{-1}\ dw$) و آبشش ($ng\ g^{-1}\ dw$) ماهی گل خورک.....	۵۸
جدول ۴-۹-۳ مقادیر سنجش شده (میانگین \pm انحراف معیار) ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در رسوبات ($ng\ g^{-1}\ dw$) و آب ($\mu g/l$).....	۶۰
جدول ۴-۱۰-۱۰ میانگین درصد همولیز سلول های گلبول قرمز ماهی گل خورک.....	۶۶
جدول ۴-۱۰-۱۱ میزان مقادیر (میانگین \pm انحراف معیار) جذب هموگلوبین سلول های لیز شده در طول موج ۳۴۰ نانومتر در ایستگاه های مختلف نمونه برداری.....	۶۷
جدول ۴-۱۱-۱۲ رابطه بین تجمع هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و نشانگر های زیستی.....	۶۸
جدول ۴-۱۲-۱۳ میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای.....	۷۰
.....	۷۱
.....	۷۲
.....	۷۳
.....	۷۴
.....	۷۵

۷۶.....	
۷۷.....	
جدول ۱۴-۱-۵ الگوی پراکنش ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد برخی از	
انواع گونه های ماهیان.....	۸۱
جدول ۱۵-۱-۵ غلظت مجموع ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) در بافت کبد گونه	
های ماهی.....	۸۲
جدول ۱۶-۲-۵ مجموع غلظت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب	
برخی اکوسیستم های دریایی.....	۸۵
جدول ۱۷-۲-۴ ریسک اکولوژیک ترکیبات آنالیز شده در نمونه های رسوب در مقایسه با میزان استاندارد	
ERM و ERL.....	۸۸

فهرست نمودارها

عنوان	شماره صفحه
نمودار ۴-۵-۱ الگوی پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های زیستی و	
غیر زیستی.....	۶۲
شکل ۴-۷-۲ میزان $CF \pm std$ و $HSI \pm std$	۶۳
شکل ۴-۷-۳ رابطه بین HSI و میزان $\Sigma 16PAH$	۶۳
شکل ۴-۸-۴ میانگین \pm انحراف معیار فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز.....	۶۴
شکل ۴-۹-۵ میانگین $NRR\ time$ نمونه های خون ماهی گل خورک در ایستگاه های نمونه برداری....	۶۵
شکل ۴-۱۰-۶ نمودار EOF ماهی گل خورک در ایستگاه های مختلف نمونه برداری.....	۶۷

فهرست اشکال

عنوان	شماره صفحه
شکل ۱-۱-۱-۲ مکانیسم سمیت بنزو ای پیرن.....	۱۷
شکل ۲-۲-۲ نقش آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در فاز دوم متابولیسم.....	۲۰
شکل ۳-۴-۳-۲ تخریب لیزویوم بر اثر عوامل آلاینده.....	۲۴
شکل ۴-۱-۴-۲ ساختار غشاء سلول گلبول قرمز خون.....	۲۷
شکل ۵-۵-۲ تصویر ماهی گل خورک	۳۰
شکل ۶-۳-۵-۲ پراکنش جغرافیایی جهانی ماهی گل خورک.....	۳۲
شکل ۷-۱-۳ موقعیت ایستگاه های نمونه برداری.....	۳۸
شکل ۸-۲-۴-۳ خونگیری از ماهی.....	۴۲
شکل ۹-۴-۵-۳ دستگاه HPLC مورد استفاده جهت آنالیز ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای.....	۴۶

چکیده

بررسی انواع بیومارکرها در تعیین سطح سلامت اکوسیستم های آبی در طرح های پایش زیست محیطی از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. در این راستا، میزان تجمع ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب، آب و بافت (بافت کبد و آبشش) ماهی گل خورک گونه *Boleophthalmus dussumieri* و برخی پاسخ های فیزیولوژیک نظیر بیوسنتز آنزیم گلوکوتاتیون-اس ترانسفراز، تغییرات غشاء لیزوزوم و میزان پایداری غشاء سلول گلبول قرمز خون ماهی گل خورک به عنوان بیومارکر مورد ارزیابی قرار گرفته است. نمونه برداری از پنج ایستگاه و در طول سواحل شمال غرب خلیج فارس (سواحل خوزستان) صورت گرفته است. جهت ارزیابی تاثیرات ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بر روی پایداری غشاء سلول، میزان تغییرات غشاء سلول گلبول قرمز پس از قرارگیری در معرض غلظت های مختلف این ترکیبات و در زمان های مختلف در شرایط آزمایشگاهی نیز مورد آنالیز و بررسی قرار گرفته است. میزان غلظت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای توسط HPLC، فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز توسط اسپکتروفوتومتر، تغییرات غشاء لیزوزوم توسط تست NRR time و میزان پایداری غشاء لیزوزوم توسط تست EOF سنجش گردید. میزان غلظت کل ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب بین $113/50 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ - $3384/34$ ، در نمونه های آب بین $18/64 - 0/80 \text{ } \mu\text{g/l}$ ، در بافت کبد بین $3/99 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ - $6/64$ و در بافت آبشش بین $3/11 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ - $17/76$ سنجش گردید. بیشترین میزان آلودگی به این ترکیبات در ایستگاه جعفری و کمترین آن در ایستگاه بحرکان مشخص گردید. کمترین میزان فعالیت آنزیم در سایت بحرکان ($7/19 \pm 1/541 \text{ nmol/mg protein/min}$) و بیشترین میزان آن در سایت جعفری ($46/96 \pm 7/877 \text{ protein/min}$) یافت شد. نتایج نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار از نظر فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز در بافت کبد ماهی گل خورک بین ایستگاه جعفری و بحرکان با یکدیگر و همچنین با دیگر ایستگاه های نمونه برداری است ($p < 0/05$)، اما بین سایر ایستگاه های نمونه برداری اختلاف معنی داری یافت نگردید ($p > 0/05$). میانگین RT نمونه های خون ماهی گل خورک در تمامی ایستگاه های نمونه برداری پایین تر از ۹۰ دقیقه بود. کمترین میزان میانگین RT نمونه های خون ماهی گل خورک در ایستگاه جعفری (۳۴ دقیقه) و بیشترین آن در ایستگاه بحرکان (۷۸ دقیقه) ثبت گردید. میانگین RT بین ایستگاه های نمونه برداری به جز ایستگاه اروند با زنگی، اختلاف معنی داری را نشان می دهد ($p < 0/05$). منحنی میزان تغییرات در پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک نسبت به شیب غلظتی نمک (منحنی EOF) در ایستگاه های مختلف نمونه برداری نشان می دهد که غشاء گلبول قرمز

ماهیان صید شده از ایستگاه جعفری در مقایسه با دیگر ایستگاه ها قوام و پایداری کمتری دارد (بسیار شکننده و ترد است) که ایستگاه های زنگی < ارونند > سمایلی < و بحرکان از این نظر در رتبه های بعدی قرار دارند. نتایج بررسی نشان می دهد که میزان پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک در ایستگاه های مختلف نمونه برداری با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ($p < 0/05$). میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک که در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با غلظت های نزدیک به محیط طبیعی قرار گرفته است، افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه های شاهد ۱ و ۲ نشان نمی دهد ($p > 0/05$). با این حال، میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض ترکیبات با غلظت حاد (Acute Potency Divisor) افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه های شاهد ۱ و ۲ نشان می دهد ($p < 0/05$). میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض ترکیبات با غلظت مزمن (Chronic Divisor Potency) در مقایسه با دیگر غلظت ها واکنش متفاوتی را نشان می دهد به نحوی که پس از قرار گیری در معرض این غلظت ها میزان همولیز کاهش می یابد. نتایج این مطالعه نشان می دهد که آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاه های نمونه برداری در شمال غرب خلیج فارس (سواحل خوزستان) از استانداردهای موجود بالاتر نیست. بیومارکهای استفاده شده در این بررسی نظیر آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز، ثبات لیزوزومی و میزان همولیز گلبول قرمز در ماهی گل خورک حساسیت زیادی را نسبت به آلودگی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای نشان دادند که این ماهی را به عنوان گونه مناسبی به عنوان شاخص زیستی معرفی می کند. وجود رابطه معنی دار بین بیومارکها و آلودگی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای نشان می دهد که این ترکیبات در مناطق نمونه برداری در دسترس زیستی ماهی گل خورک قرار دارند. نتایج این بررسی نشان می دهد که مطالعه بیومارکها نه تنها در ارزیابی تاثیرات بیولوژیک و فیزیولوژیک آلاینده ها بر آبزیان مفید هستند بلکه در تعیین و ارزیابی در دسترس بودن زیستی عوامل آلاینده اثرگذار هستند. نتایج همچنین نشان می دهد که ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای دارای خاصیت آنتی همولیتیک می باشند.

فصل اول: کلیات تحقیق

۱-۱ مقدمه:

پیشرفت های دانش فنی و دستیابی انسان به نیرو های جدید برای استفاده از طبیعت موجب بهره برداری بی رویه از طبیعت و عدم توجه به ظرافت های آن باعث گردیده که زمین از این بابت دچار آفات زیانباری گردد. از سوی دیگر، انسان از دیرباز تاکنون در اندیشه استفاده از پهنه های آبی، بخصوص دریاها و اقیانوس ها بعنوان مکان دفع زایدات بوده است. مسئله آلودگی محیط زیست در سال های اخیر بحران بزرگی بوجود آورده و کلیه فعالیت های انسان در رابطه با طبیعت را تهدید می کند. آلودگی های دریایی بخش قابل توجهی از بحران آلودگی محیط زیست را تشکیل می دهد. در سال های اخیر برای تامین نیاز های غذایی، توجه بیشتری به منابع دریایی معطوف گشته است. در آبزیان که از منابع غذایی انسان محسوب می شوند، عناصر شیمیایی تخلیه شده در دریاها در بدن آنها تجمع یافته و در جریان چرخه های زیستی، این مواد به سطوح بالاتر و در نهایت به انسان منتقل می شوند (Yilmaz et al., 2007). با پیشرفت تکنولوژی و بالطبع توسعه صنایع مختلف مرتبط با نفت از قبیل پالایشگاه و پتروشیمی، میزان زیادی از ترکیبات نفتی و یا تولیدات وابسته به آن مخصوصا هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای^۱ وارد اکوسیستم های آبی گردیده است. آلاینده های آلی نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به میزان قابل توجهی توسط ارگانیسم های آبی نظیر ماهیان جذب می شوند (Tolosa et al., 2005). به دلیل خاصیت چربی دوستی، این ترکیبات به میزان بیشتری در بدن موجودات آبی نسبت به ستون آب یافت می شوند (Zuloaga et al., 2009)، اما بخش عمده ای از هیدروکربن های آروماتیک چند-حلقه ای در اکوسیستم های آبی با جذب توسط ذرات معلق موجود در آب، رسوب کرده و بر روی جوامع کفزی اثر می گذارند (Valavanidis et al., 2008). هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در غلظت های بالا منجر به کاهش رشد، مزاحمت در مبادله مواد و ایجاد اختلال در بدن آبزیان می شوند. این ترکیبات از راه های مختلف گوارشی، تنفسی و پوستی وارد بدن شده و بسته به نوع، جنس، شرایط محیطی و نیز سن موجود، در اندام های مختلف بدن با اختلاف زیاد انباشته می گردند. این ترکیبات به علت اثرات سمی و توان تجمع در گونه های مختلف آبزیان و وارد شدن به زنجیره های غذایی از اهمیت ویژه ای در مباحث تاکسیکولوژیک برخوردار می باشند. چنانچه میزان این عناصر به دلایل گوناگونی از حدود معینی

^۱ Poly Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

فراتر رود باعث به مخاطره افتادن حیات آبزیان می گردد ، زیرا بر هم خوردن تعادل بوم شناختی شده و موجب زوال زیستی اکوسیستم را فراهم می آورد (Canli and Atli, 2003). با توجه به خاصیت تجمع زیستی این عناصر و دخالت در عملکرد فیزیولوژیک بافت های مختلف موجودات آبرزی مطالعات زیادی در خصوص میزان جذب و تجمع هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در آبزیان اکوسیستم های آبی صورت گرفته است.

خلیج فارس دریای نیمه بسته است که اکوسیستم منحصر به فردی دارد و با توجه به قرار گرفتن آن در منطقه ای گرم و خشک ، آبزیان ساکن در این دریا نسبت به تغییرات محیطی بسرعت واکنش نشان می دهند و با قرار گرفتن در معرض آلودگی ها به ویژه آلودگی نفتی بشدت آسیب می بینند. به رغم حساسیت بالای این اکوسیستم در برابر آلاینده های مختلف در سطح دریاها این منطقه از تنوع زیستی بسیار زیادی برخوردار است و در مقایسه با دیگر زیستگاه های آبی در سراسر دنیا به دلیل ویژگی های حاکم بر آن بسیار آسیب پذیر بوده و وجود کمترین آلودگی در آب می تواند سلامت آبزیان و دیگر موجودات زنده ساکن آب را در معرض خطر جدی قرار دهد. با توجه به منابع آلاینده مختلف در خلیج فارس به ویژه آلودگی نفتی احتمال بالا بودن میزان هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در خلیج فارس و جذب و تجمع آن در قسمت های مختلف بدن ماهیان که نهایتا می تواند وارد زنجیره غذایی و بدن انسان گردد، وجود دارد. سنجش هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در ارگانسیم های آبی می تواند به عنوان شاخص زیستی از تاثیرات این ترکیبات بر ارگانسیم ها و سلامت اکوسیستم مطرح باشد (Zuloaga et al., 2009)، امامحاسبه دقیق و درست اثرات وارده از جانب هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای را می بایست در مطالعات نشانگر های زیستی جستجو کرد. آنها نسبت به شاخص های زیستی دقیق تر و دارای ارزش بالاتری هستند چرا که براساس تغییرات فیزیولوژیکی در سطح ارگانسیم مطرح می باشند (Ali et al., 2008).

در این تحقیق میزان تجمع زیستی هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای و برخی پاسخ های فیزیولوژیک نظیر فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز به عنوان یکی از مهم ترین آنزیم های فاز دوم متابولیسم سمیت زدایی آلاینده های آلی، تغییرات غشاء لیزوزوم و نیز تغییرات میزان پایداری و یکپارچگی غشاء گلبول قرمز خون ماهی گل خورک در سواحل شمال غرب خلیج فارس (سواحل خوزستان) مورد بررسی و آنالیز قرار گرفته است. از سوی دیگر، میزان تغییرات غشاء گلبول قرمز در زمان قرار گیری در معرض ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در شرایط آزمایشگاهی نیز مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. نتایج حاصله ضمن تعیین میزان توانایی ماهی در تجمع زیستی و بروز پاسخ های سمیت زدایی به عنوان مکانیسم حفاظتی و نیز بررسی برخی پاسخ های فیزیولوژیک بروز سمیت

در این گونه، می تواند رهنمودی برای تعیین سطح سلامت اکوسیستم با استفاده از نشانگر های زیستی که سلامت مصرف کننده را به دنبال دارد نیز در پی داشته باشد. مهم ترین اهدافی که در این تحقیق دنبال شده عبارتند از :

۱- بررسی میزان آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ماهی گل خورک گونه *Boleophthalmus dussumieri* سواحل شمال غربی خلیج فارس

۲- مطالعه مکانیسم های سمیت زدایی این گونه در زمان قرار گیری در معرض هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

۳- ارزیابی استفاده از پاسخ های فیزیولوژیک ماهی به عنوان بیومارکر در بیومانیترینگ محیطی

۴- مقایسه پاسخ های فیزیولوژیک ماهی گل خورک نسبت به حضور آلاینده در ایستگاه های مختلف

۵- بررسی الگوی تجمع زیستی در بافت های کبد و آبشش

۶- مطالعه و بررسی ظرفیت بافت های کبد و آبشش در تجمع و یا سمیت زدایی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

۷- مطالعه و بررسی تغییرات غشایی گلبول قرمز به عنوان بیومارکر در ارزیابی اثرات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

با انجام این تحقیق مشخص خواهد شد که میزان توانایی گونه گل خورک در تجمع زیستی و نیز واکنش حفاظتی موجود نسبت به آن در کدام بافت از این ماهی چه میزان است. علاوه بر آن مقایسه ای بین تجمع زیستی و پاسخ فیزیولوژیک در بافت های مختلف به منظور تعیین میزان کارایی بافت ها در تجمع و نیز سمیت زدایی صورت خواهد گرفت. عمده ترین کاربرد این تحقیق امکان سنجی استفاده از پاسخ های فیزیولوژیک به عنوان بیومارکر در اکوسیستم های آبی جهت تعیین سطح سلامت اکوسیستم پیش از آنکه اثرات و خطرات جبران ناپذیری بر آن وارد گردد است، که در نهایت سلامت مصرف کننده را در پی خواهد داشت. در نهایت پیشنهادات و راهبرد های لازم جهت اعمال مدیریت بهتر در طرح های پایش زیست محیطی اکوسیستم های دریایی ارائه خواهد شد.

۱-۲ خلیج فارس

خلیج فارس یا خلیج پارس آبراهی است که در امتداد دریای عمان و در میان ایران و شبه جزیره عربستان قرار دارد. خلیج فارس در جنوب ایران بین ۲۴ تا ۳۰ درجه و ۳۰ دقیقه عرض شمالی و ۴۸ تا ۵۶ درجه و ۲۵ دقیقه طول شرقی از نصف النهار گرینویچ قرار دارد. مساحت آن ۲۳۳،۰۰۰ کیلومتر مربع است، و پس از خلیج مکزیک و خلیج هودسن سومین خلیج بزرگ جهان بشمار می آید (Tolosa et al., 2005).

خلیج فارس از شرق از طریق تنگه هرمز و دریای عمان به اقیانوس هند و دریای عرب راه دارد، و از غرب به دلتای رودخانه اروندرود، که حاصل پیوند دو رودخانه دجله و فرات و پیوستن رود کارون به آن است، ختم می‌شود. کشورهای ایران، عمان، عراق، عربستان سعودی، کویت، امارات متحده عربی، قطر و بحرین در کناره خلیج فارس هستند. زمین شناسان معتقدند که در حدود پانصد هزار سال پیش، صورت نخستین خلیج فارس در کنار دشت‌های جنوبی ایران تشکیل شد و به مرور زمان، بر اثر تغییر و تحول در ساختار درونی و بیرونی زمین، شکل ثابت کنونی خود را یافت.

خلیج فارس با دارا بودن ویژگی‌های جغرافیایی و ارزشهای بوم‌شناختی و همچنین مشخصات آب‌شناسی (فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی) خاص خود، یکی از نادرترین بوم‌سازگان‌ها به شمار می‌رود که مجموعه‌ای از موجودات زنده منحصر به فردی را بوجود آورده است. علاوه بر آن خلیج فارس از محدوده‌ها و مناطق مشترک خشکی و دریا (Ecoton) و یا به عبارت دیگر، نواحی ساحلی متنوعی تشکیل شده است. محیط زیست ساحلی این حوضه در واقع یک سیستم تکامل یافته طبیعی و در برگیرنده پیچیده‌ترین و در عین حال غنی‌ترین بوم‌سازگان‌های مولد بر روی کره زمین می‌باشد.

به طور کلی تنوع محیطی و زیستگاهی در حوزه خلیج فارس موجب حضورگونه‌های بسیار متنوعی از جوامع گیاهی شامل فیتوپلانکتونها، جلبکها، علفهای دریایی و همچنین جوامع جانوری شامل گروه عظیمی از بی‌مهرگان نظیر اسفنجها، مرجانها، شقایق‌ها، خارتنان، نرم‌تنان، سخت‌پوستان و مهره‌داران دریایی و وابسته به محیط دریا من جمله ماهیان، خزندگان، پستانداران و پرندگان شده است. چنانکه ماهی و دیگر جانوران دریایی آن (مانند میگو و خرچنگ) یکی از اقلام صادراتی و تجاری کشور‌های منطقه را تشکیل می‌دهد. جدا از آن مروارید و مرجان نیز از جمله دیگر ذخائر دریایی منطقه است که بویژه مروارید خلیج فارس از قرن‌ها قبل شهرت جهانی داشته است.

محیط زیست دریایی خلیج فارس به علت شرایط اکولوژیک خاص و بهره‌گیری‌هایی که به طور مستمر از این محیط و منابع آن می‌شود، در معرض مخاطراتی قرار گرفته است. خصوصیت نیمه بسته بودن خلیج فارس همراه با پایین بودن میزان جابجایی و تبادل آب با دریای عمان، کمبود میزان بارندگی سالانه و کافی نبودن آب‌های ورودی به محیط به همراه نرخ تبخیر بالا، به طور طبیعی ظرافت خلیج فارس را در زمینه ی پخش و پراکندگی و خودپالایی آلودگی‌ها محدود ساخته است.

به سبب وجود منابع سرشار نفت و گاز در خلیج فارس و سواحل آن، این آبراهه در سطح بین‌المللی و منطقه‌ای مهم و راهبردی بشمار می‌آید. میزان پالایش آلودگی از جمله آلودگی نفتی در آن ۳/۱ درصد مجموع

آلودگی جهانی و ۴۷ بار بیشتر از حد متوسط مورد قبول محیط زیست دریایی درحجم برابراست. دراین مورد سازمان های ذیربط بین الملل ازجمله برنامه های محیط زیست ملل متحد، خلیج فارس را همراه با دریای مدیترانه، دریای بالیتک، دریای سرخ و دریای سیاه جزء مناطق ویژه محسوب و مقررات خاص و شدیدی جهت حفاظت و کنترل آلودگی های آن وضع و اعلام کرده اند (Tolosa et al., 2005).

۳-۱ هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای یکی ازسمی ترین ترکیبات آلی محسوب شده که دارای رفتار بسیار پیچیده ای در طبیعت است (Abdel-Rahman et al., 2002). به دلیل خاصیت سرطان زایی و جهش زایی این ترکیبات به عنوان یکی از آلاینده های مهم و خطرناک در لیست سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (EPA^۲) قرار گرفته است (Chimezie et al., 2005). هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ناشی از فرایند های طبیعی در طول میلیون ها سال در خلال چرخه های بیوژئو شیمیایی زمین حضور داشته اند. با این حال افزایش استفاده از سوخت های فسیلی و سایر ترکیبات توسط انسان به ویژه پس از دوره صنعتی شدن جهان منجر به افزایش بی رویه حضور این ترکیبات در طبیعت شده است. به دلیل پیچیدگی و فراگیر بودن آلودگی به هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در شبکه غذایی دریایی و خاصیت چربی دوستی این ترکیبات آلودگی هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای تبدیل به مسئله جهانی گردیده است که نیازمند توجه و تلاش جامعه جهانی به آن است (Durand et al. 2004). سالانه در حدود ۴۳۰۰۰ تن از این ترکیبات وارد اتمسفر و در حدود ۲۳۰۰۰۰ تن از طرق مختلف وارد محیط های آبی می گردد (CCME, 2010). مقدار کمی ازاین میزان مربوط به منابع طبیعی است (فعالیت های آتشفشانی، فعالیت های میکروبی و)، اما مقادیر بالای آن مربوط به آتش سوزی جنگل ها و فعالیت های انسانی است. جدول ۱-۳-۱ میزان تخلیه سالانه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به اتمسفر و محیط های آبی ناشی از فعالیت های مختلف را نشان می دهد.

^۲ Environmental Protection Agency

جدول ۱-۳-۱ میزان تخلیه سالانه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به اتمسفر و محیط های آبی (CCME, 2010)



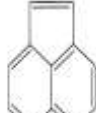
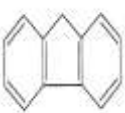
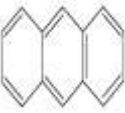
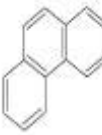
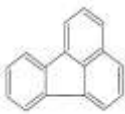


منبع	اتمسفر	منبع	اکوسیستم آبی
آتش سوزی جنگل ها و مراتع	۱۹,۵۱۳	ریزش و نشت نفتی	۱۷۰,۰۰۰
سوختن مزارع کشاورزی	۱۳,۰۰۹	ریزش اتمسفری	۵۰,۰۰۰
سوختن زباله و پسماندها	۴,۷۶۹	فاضلاب و پسماندها	۴,۴۰۰
خاکستر	۳,۹۰۲	رواناب ها	۲,۹۴۰
سیستم های گرمایشی و تولید نیرو	۲,۱۶۸	سنتز زیستی	۲,۷۰۰
پروسه های صنعتی (تولید کک)	۱,۰۴۵		
وسایل موتوری	۴۵		

۱-۳-۱ شیمی هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای:

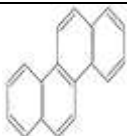
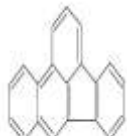
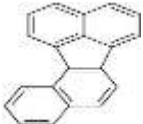
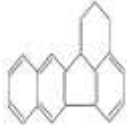
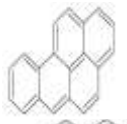

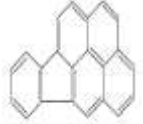

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از اتم های کربن و هیدروژن تشکیل شده که این اتم ها به فرم های حلقه ای (به تعداد ۲ یا بیشتر)، خطی و خوشه ای قرار گرفته است. این ترکیبات فاقد گروه های عاملی (کربوکسیل، هیدروکسیل، آمین و ...) می باشند از این رو به لحاظ شیمیایی نسبتاً غیر فعال بوده و ترکیبات پایداری محسوب می شوند. وزن مولکولی ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بسته به تعداد حلقه های بنزنی از ۱۲۸/۱۶ تا ۳۰۰/۳۶ متغیر است (CCME, 2010). ویژگی های فیزیکی و شیمیایی این ترکیبات با وزن مولکولی آنها تغییر می کند. با افزایش وزن مولکولی قابلیت حرکت، میزان حلالیت در آب، فشار بخار و مقاومت به اکسیداسیون و احیا کاهش می یابد، با این حال نقطه جوش، نقطه ذوب، حلالیت در چربی این ترکیبات با افزایش وزن مولکولی افزایش می یابد. تعادل بین چربی دوستی و آب دوستی این ترکیبات با ضریب اکتانول و آب (K_{ow}) نشان داده می شود. مقدار K_{ow} تعیین کننده این است که چگونه یک ترکیب در مجاورت با موانع قطبی و غیر قطبی در بدن موجودات زنده پخش می شود. ترکیباتی که K_{ow} بالایی دارند میزان قطبیتشان کم است و تحت عنوان چربی دوست یا آب گریز شناخته می شوند. پخش، پراکنش و همچنین میزان سمیت ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای وابستگی زیادی به میزان چربی دوستی (که با K_{ow} نشان داده می شود) و تمایل آنها به جذب شدن توسط کربن آلی موجود در ذرات معلق (که با K_{oc} نشان داده می شود) دارد. در دسترس بودن زیستی (Bioavailability) و سمیت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بر

اساس فرم های مختلف آن و نیز تفاوت در ویژگی های آن متفاوت می باشد. سرنوشت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در محیط بستگی به فرم شیمیایی مختلف آن و شرایط محیطی دارد. تفاوت در این ویژگی ها منجر به ایجاد تغییر در رفتار و پراکنش آنها در طبیعت و همچنین میزان و نحوه تاثیر آنها بر جانداران می گردد (Valavanidis *et al.*, 2008). جدول ۱-۳-۱ ویژگی های فیزیکی و شیمیایی ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را نشان می دهد (CCME, 2010).

جدول ۱-۳-۲ ویژگی های فیزیکی و شیمیایی ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (CCME, 2010)

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs)	ساختار	وزن مولکولی	حلالیت در آب (mg/l) در دمای ۲۵°C	Log KOW	Log KOC	فشار بخار (mmHg) در دمای ۲۵°C
Naphthalene		۱۲۸	۳۱/۷	۳/۳۶	۲/۷-۳/۰	$8/5 \times 10^{-2}$
Acenaphthene		۱۵۴	۳/۹	۳/۹۲	۳/۳-۳/۶	$2/5 \times 10^{-3}$
Acenaphthylene		۱۵۲	۱۶/۱	۳/۹-۴/۱	۳/۷۵	$9/12 \times 10^{-4}$
Fluorene		۱۶۶	۱/۹	۴/۱۸	۳/۴۵-۳/۹۵	$7/33 \times 10^{-3}$ to $8/42 \times 10^{-3}$
Anthracene		۱۷۸	۰.۰۷۵/ ۰.۰۴۳	۴/۴۵-۴/۵۵	۴/۲-۴/۴	$2/77 \times 10^{-6}$
Phenanthrene		۱۷۸	۱/۱۵	۴/۴۶-۴/۵۵	۳/۴-۴/۳	$1/12 \times 10^{-4}$
Fluoranthene		۲۰۲	$2/6 \times 10^{-1}$	۴/۹۵	۴/۶۲	$1/23 \times 10^{-8}$
Pyrene		۲۰۲	۱/۳۵	۴/۸۸-۵/۱۸	۴/۶-۵/۱	$2/45 \times 10^{-6}$ to $4/59 \times 10^{-6}$
Benz[a]anthracene		۲۲۸	$9/4 \times 10^{-3}$	۵/۷	۵/۳	$3/05 \times 10^{-8}$ to $1/05 \times 10^{-7}$

ادامه جدول ۱-۳-۲ ویژگی های فیزیکی و شیمیایی ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (CCME, 2010)

Chrysene		۲۲۸	$2/0 \times 10^{-3}$ to $6/3 \times 10^{-3}$	۵/۷	۵/۱	$6/23 \times 10^{-9}$
Benzo[b]fluoranthene		۲۵۲	$1/5 \times 10^{-3}$	۶/۲	۵/۲	$5/0 \times 10^{-9}$
Benzo[j]fluoranthene		۲۵۲	$6/8 \times 10^{-3}$	۶/۱۲	۴/۷-۴/۸	$1/5 \times 10^{-8}$
Benzo[k]fluoranthene		۲۵۲	$8/0 \times 10^{-4}$	۶/۲	۴/۳	$2/0 \times 10^{-9}$
Benzo[a]pyrene		۲۵۲	$1/6 \times 10^{-3}$	۵/۹۷	۶/۰-۶/۷	$5/49 \times 10^{-9}$
Benzo[g,h,i]perylene		۲۷۶	$2/6 \times 10^{-5}$	۶/۷	۵/۶۱	$1/0 \times 10^{-10}$
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene		۲۷۶	$2/2 \times 10^{-5}$	۶/۶	۶/۲	$1/0 \times 10^{-10}$
Dibenz[a,h]anthracene		۲۷۸	$2/49 \times 10^{-3}$	۶/۵	۵/۸-۶/۵	$1/0 \times 10^{-10}$

۱-۳-۲ هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در اکوسیستم های آبی:

ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از طریق رودخانه، مصب، آب های ساحلی و اتمسفر وارد اکوسیستم های دریایی می گردد. پس از اینکه این ترکیبات وارد اکوسیستم های آبی می شوند سریعاً جذب ذرات آلی و غیر آلی شده و در رسوبات ته نشین می شوند. ته نشین شدن این ترکیبات در رسوبات منجر به افزایش پایداری و نیز مقاومت آنها نسبت به واکنش های اکسیداسیون و نیتراسیون می گردد. به

طور کلی غلظت این ترکیبات با افزایش فاصله از منبع ورودی کاهش می یابد. زمانی که ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بخش های غیر هوازی رسوبات وارد می شوند برای مدت طولانی در آنجا باقی می مانند، در حالی که ترکیباتی که در معرض نور قرار دارند وارد پروسه های فتوشیمیایی می شوند که این امر منجر به جداشدن این ترکیبات از رسوبات و قرار گیری آنها در معرض جانداران می گردد (Zuloaga *et al.*, 2009).

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای توسط ماهی و سایر ارگانیسم های دریایی از طریق غذای مصرفی، آب و رسوبات جذب می شوند. به طور کلی میزان غلظت این ترکیبات در رسوبات بیشتر از جانداران و در جانداران بیشتر از آب است. یکی از فاکتور های مهم و تاثیر گذار بر روی میزان دسترسی زیستی آلاینده ها میزان مواد آلی محلول (DOM^3) است، به نحوی که در دسترس بودن زیستی آلاینده های آلی با افزایش میزان مواد آلی محلول کاهش می یابد (Chimezie *et al.*, 2005).

فصل دوم: مروری بر ادبیات تحقیق و پیشینه تحقیق

۲-۱ سمیت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای:

هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای به دلیل فقدان گروه های عاملی واکنش پذیری کمی دارند که این امر منجر به کاهش اثرات سمی این ترکیبات شده است. سمیت این ترکیبات بیشتر در نتیجه تبدیل آنها به محصولات واکنش پذیرتر است که تحت فرایندهای شیمیایی و یا بیوشیمیایی رخ می دهد. به عنوان مثال فتواکسیداسیون این ترکیبات منجر به تشکیل محصولات واکنش پذیر تر می گردد، که سمیت آنها را به میزان زیادی افزایش می دهد (Barton *et al.*, 2005). به طور کلی با افزایش وزن مولکولی و جاگزینی ترکیبات آلکیل به حلقه های آروماتیک میزان سمیت این ترکیبات افزایش می یابد. زمانی که این ترکیبات به اکوسیستم های آبی وارد می شوند به دلیل بالا بودن میزان Kow به راحتی توسط ترکیبات آلی سطح ذرات معلق یا رسوبات جذب می شوند و از سوی دیگر به دلیل خاصیت چربی دوستی به راحتی وارد بدن موجودات می شوند (Chimezie *et al.*, 2005). ورود این ترکیبات به رسوبات در کنار پایداری طولانی مدت آنها منجر به بروز اثرات سمی به مراتب بیشتری بر موجودات کفزی می شود. با این حال ترکیبات مختلف هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای تاثیرات فیزیولوژیک متعددی بر روی ارگانیسم های آبی بر جای می گذارند اما میزان سمیت این ترکیبات در ارگانیسم های مختلف متفاوت است (Zuloaga *et al.*, 2009). سمیت این ترکیبات در ارگانیسم های آبی تحت تاثیر فاکتور های زیستی و غیر زیستی متعددی شامل ترکیبات مختلف آن، شرایط محیطی (دما، شوری، اکسیژن، pH)، میزان حساسیت یا مقاومت گونه های مختلف و است (Zuloaga *et al.*, 2009). تاثیر میزان حساسیت یا مقاومت گونه های مختلف ارگانیسم های آبی نسبت به ترکیبات مختلف هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای به میزان قابل توجهی نسبت به سایر موارد بیشتر است. تاثیرات سمی شامل آسیب های عصبی، اختلالات تولید مثلی، اختلال در رشد، ایجاد ناهنجاری در رشد، ایجاد تغییرات در پاسخ های رفتاری، کاهش تنفس و نرخ ضربان قلب، افزایش وزن کبد، کلیه و کیسه شنا، کاهش میزان فتوسنتز و می باشد (Van der Oost *et al.*, 2003 ;Tuvikene, 1995 ;Rojas *et al.*, 2004). بیشترین

سمیت ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای مربوط به سمیت سلولی (سیتوتاکسیک)، جهش زایی و به ویژه سرطان زایی می باشد.

۲-۱-۱ مکانیسم سمیت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای:

همان طور که ذکر گردید سمیت این ترکیبات بیشتر در نتیجه تبدیل آنها به محصولات واکنش پذیرتر است. تشکیل متابولیت دیول اپوکساید که دارای واکنش پذیری بالایی نسبت به ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای است یکی از مهم ترین راه های افزایش سمیت این ترکیبات است. مکانیسم تشکیل این متابولیت توسط تئوری Bay region برای اولین بار توسط Jerina و همکاران در سال ۱۹۷۶ مشخص گردید. مکانیسم تشکیل دیول اپوکساید بر اساس این تئوری به شرح زیر است:

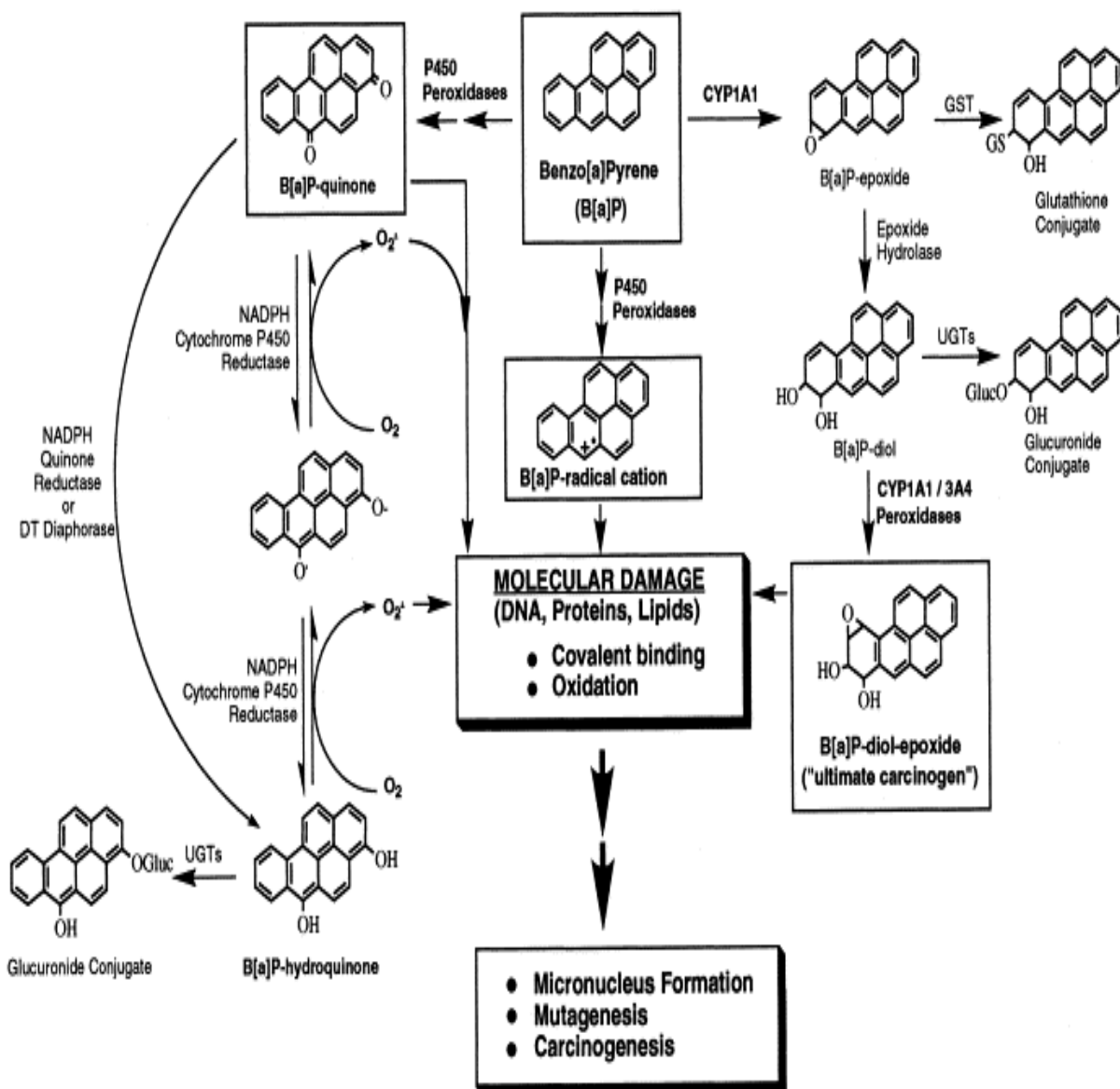
زوایای موجود در حلقه های بنزنی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای منجر به تشکیل ساختارهای دندانه ای شکل در این ترکیبات می شود که تحت عنوان Bay region اطلاق می گردد. این ساختارها در ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در محل های مختلفی قرار دارند. به عنوان مثال در ترکیب بنزو ای پیرن، این منطقه شامل چهارکربن (کربن شماره های ۱۰a، ۱۰b، ۱۱ و ۱۲) و سه باند کربن-کربن می باشد. متابولیسم بنزو ای پیرن توسط آنزیم سیتوکروم اکسیداز در باند کربن $C_7 - C_8$ منجر به تشکیل ترکیب arene oxide (benzo[a] pyrene-7,8 oxide) می شود. این ترکیب که با اشباع باند های کربن-کربن منجر به تخریب هسته های آروماتیک می شود به نوبه خود توسط اپوکساید هیدرولاز هیدراته شده و ترکیب benzo[a] pyrene-7,8-diol تشکیل می شود. این ترکیب نیز در محل باند کربن $C_9 - C_{10}$ توسط آنزیم سیتوکروم اکسیداز متابولیزه شده و ترکیب benzo[a] pyrene-7,8-diol-9,10 oxide را تشکیل می دهد. این ترکیب به دلیل دارا بودن یون کربونیوم در محل کربن شماره ۱۰ دارای واکنش پذیری بالایی است. این ترکیب می تواند با نوکلئوفیل ها نظیر DNA و پروتئین ها واکنش داده و ترکیبات اضافی را تولید کند. یکی از راه های سنجش میزان فعالیت ترکیبات دیول اپوکساید سنجش میزان انرژی دلوکالیزاسیون یون کربونیوم ($\Delta E_{deloc}/B$) است. بالاتر بودن میزان این انرژی نشانگر بالاتر بودن فعالیت و واکنش پذیری یون کربونیوم است. هر ترکیب دیول اپوکساید می تواند به چهار فرم Syn & anti diol epoxides وجود داشته باشد. زمانی که این متابولیت ها با DNA واکنش می دهند (اکثرا با بازهای پورین، داکسی گوانین و داکسی آدنوزین)، هر کدام از آنها می توانند چهار فرم مختلف ترکیبات اضافی DNA (trans & cis) را ایجاد کنند. همان طور که ملاحظه می شود در مجموع شانزده ترکیب اضافی DNA می تواند تشکیل شود، اما در اکثر موارد ترکیبات کمتری تشکیل می گردد.

علاوه بر موارد ذکر شده ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و متابولیت های آنها می توانند منجر به تحریک جهش در ژن های خاص مرتبط با سرطان نیز گردند.

بخش های دیگری در ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای تحت عنوان fjord region حاوی ۵ اتم کربن و ۴ باند کربن-کربن است. تئوری Bay region در مورد هیدروکربن هایی که در ساختار آنها دندانهای محیطی عمیق تری وجود دارد نسبت به ترکیباتی که حاوی fjord region هستند بیشتر گسترش یافته است. در برخی از موارد اندرکنش بین اتم ها در بخش fjord region منجر به بهم خوردن ساختار دوجهی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می شود. بهم خوردن ساختار دوجهی سبب افزایش واکنش پذیری متابولیت های دیول اپوکساید نسبت به متابولیت هایی که واکنش پذیری آنها از طریق انرژی دلوکالیزاسیون یون کربونیوم محاسبه می گردد می شود. شکل ۱-۱-۲ مکانیسم سمیت ترکیب بنزوای پایرن نشان داده شده است.

به طور کلی تشکیل و تخریب ترکیبات دیول و دیول اپوکساید به میزان زیادی به جنس، گونه، نوع بافت و ارگان، جنسیت و نوع آنزیم سیتوکروم و بستگی دارد (Aklillu et al., 2002). به عنوان مثال آنزیم سیتوکروم نسبت به محل اثرگذاری و همچنین نوع ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای اختصاصیت دارد. اختصاصیت آنزیم سیتوکروم نسبت به ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در کنار ظرفیت بالای اتم های کربن این ترکیبات، منجر به تشکیل فرم های گوناگونی از متابولیت می گردد (Andrýsik et al., 2005).

بر اساس آنچه ذکر گردید مکانیسم سمیت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بر اساس تئوری های fjord region و Bay region منجر به افزایش فعالیت و واکنش پذیری ترکیبات می شود. اما این روند در مورد تمامی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای صدق نمی کند. به عنوان مثال ترکیبات دیول اپوکساید ناشی از متابولیسم phenanthrene واکنش پذیر نیستند (Balu et al., 2004).



شکل ۲-۱-۱-۱-۱ مکانیسم سمیت بنزو ای پیرن (Kim et al., 1997)

۲-۲ متابولیسم هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای:

اکثر موجودات توانایی حداقلی در متابولیزه کردن آلاینده های خارجی را دارا می باشند. تغییر فرم شیمیایی آلاینده ها توسط فرایندهای زیستی (متابولیسم) و یا فیزیکی (فتواکسیداسیون) به میزان زیادی بر میزان در دسترس بودن، سمیت، پراکنش، واکنش پذیری و حلالیت آنها تاثیر گذار است. به عنوان مثال نیمه عمر ترکیبات چربی دوست بدون پروسه های بیوشیمیایی (که آنها را آب دوست تر و قابل دفع تر می کند) به میزان زیادی افزایش می یابد. به طور کلی متابولیسم و انتقال زیستی مواد آلاینده دو هدف مهم را دنبال

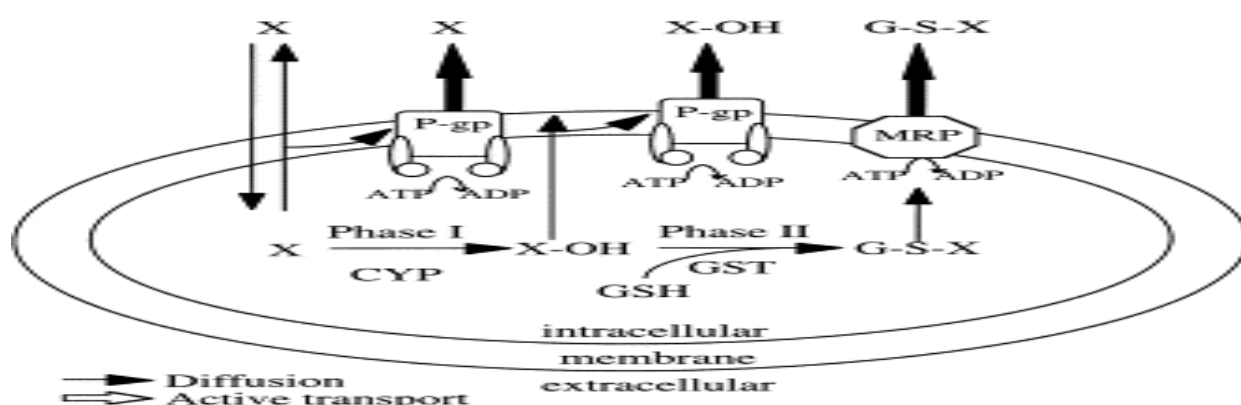
می کند که این اهداف عبارتند از: کاهش اثرات سمی و آسان تر کردن دفع آنها از بدن. مسیر اصلی متابولیسم ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به صورت زیر است:

به دلیل اینکه این ترکیبات چربی دوست هستند به راحتی از طریق پروسه انتقال غیر فعال وارد سلول می شوند و در آنجا به گیرنده های Ah-receptor متصل می گردند. اتصال به این گیرنده ها منجر به تنظیم و تحریک آنزیم ها و ژن های مرتبط با متابولیسم و انتقال زیستی می گردد. در طی فرایند متابولیسم دو مرحله تحت عنوان فاز اول و فاز دوم وجود دارد. در فاز اول آلاینده های آلی در نتیجه فرایند های اکسیداسیون، احیا، هیدرولیز و هیدراته شدن به متابولیت هایی با حلالیت بیشتر در آب تبدیل می شوند. در واقع در نتیجه فرایند های مذکور متابولیت هایی که به آنها ترکیباتی نظیر SH, NH₂, COOH, OH متصل شده است تولید می گردد. برخی از این موارد در ارگانسیم های آبی مشترک است اما روش و نحوه کار و مشارکت گروه های مختلف در گونه های مختلف متفاوت است (CCME, 2010).

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای فاقد گروه های عاملی هستند به همین دلیل در فاز اول متابولیسم آنها فقط فرایند های اکسیداسیون رخ می دهد. اکسیداسیون توسط سیستم آنزیمی تحت عنوان MFO^۴ کاتالیز می شود. سیستم MFO یکی از مهم ترین و گسترده ترین آنزیم ها در متابولیسم فاز اول ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ارگانسیم های آبی محسوب می شود که شامل مونو اکسیژنازها (گروه آنزیم های سیتوکروم P450) است. اکثر این آنزیم ها در محیط های غشایی آب گریز به ویژه در شبکه آندوپلاسمی کبد یافت می شوند. در نرم تنان و اغلب بی مهره گان آبی به دلیل عدم وجود این آنزیم ها توانایی متابولیزه کردن ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بسیار کم و ناچیز است. در واکنش هایی که آنزیم های سیتوکروم شرکت می کنند یک مولکول اکسیژن و دو الکترون به ترکیبات اضافه می گردد. ذخیره الکترون در این واکنش^۵ NADPH و یا^۶ NADH است. آنزیم سیتوکروم معمولاً به عنوان آخرین اکسیداز در زنجیره چند ترکیبی انتقال الکترون عمل می کند. فعالیت آنزیم سیتوکروم منجر به افزایش فعالیت آنزیم هایی نظیر^۷ AHH, ^۸ EROD و ^۹ ECOD می شود. نتیجه نهایی تمامی این واکنش ها در فاز اول متابولیسم اضافه شدن اتم اکسیژن یا فرم احیا شده هیدروکسیل به ترکیبات است که این امر منجر به افزایش خاصیت آب دوستی این ترکیبات می گردد (CCME, 2010).

^۴ Mix Function oxidase
^۵ Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase
^۶ Nicotinamide Adenine Dinucleotide
^۷ Aryl Hydrocarbon Hydroxylase
^۸ Ethoxyresorufin-O-deethylase
^۹ 7-ethoxy coumarin-o-devthylase

فاز دوم متابولیسم شامل اضافه شدن ترکیبات قطبی نظیر گلوکوتاتیون، سولفات، گلوکرونیک اسید، آمینو اسید به آلاینده و یا متابولیت آن است. یک سری از آنزیم ها پروسه انتقال گلوکز و گلوکرونیک را از ^{۱۰}UDPG و ^{۱۱}UDPGA (پروسه های Glucuronidation و Glucosidation) به اتم های اکسیژن، نیتروژن و یا سولفور در ماده آلاینده کاتالیز می کنند که تحت عنوان گلوکز و گلوکرونیک اسید ترانسفراز معروف هستند. در میان ارگانایسم های آبی Glucuronidation یکی از مهم ترین راه های کونژوگه شدن در ماهی محسوب می گردد در حالی که در بی مهرگان مسیر Glucosidation از مهم ترین راه های تولید ترکیبات کونژوگه محسوب می گردد. یک سری دیگر از آنزیم ها انتقال سولفات از ^{۱۲}PAPS به اتم های اکسیژن یا نیتروژن در ماده آلاینده را کاتالیز می کنند. کونژوگه شدن سولفات دارای ظرفیت پایین ولی تمایل و شدت بالایی است، اما این واکنش آنزیمی در مورد ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای کمتر رخ می دهد. یکی دیگر از آنزیم های مهم که به میزان گسترده ای در موجودات آبی و خشکی وجود دارد و انتقال تری پتیدگلوکوتاتیون را به آلاینده و یا متابولیت آن کاتالیز می کند گلوکوتاتیون اس-ترانسفراز ^{۱۳} می باشد (شکل ۲-۲-۲). البته قابل ذکر است که پس از انتقال تری پتیدگلوکوتاتیون، متابولیت کونژوگه شده وارد مرحله دیگری می شود که در این مرحله توسط آنزیم هایی نظیر پپتیداز و N-اسیل ترانسفراز به کونژوگه mercapturic acid متابولیزه می گردد. از دیگر آنزیم هایی که در فاز دوم متابولیسم فعالیت کرده و کربوکسیلیک اسید را به آلاینده و یا متابولیت آن کونژوگه می کند اسیل ترانسفراز را می توان نام برد (Bard, 2000).



شکل ۲-۲-۲ نقش آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز در فاز دوم متابولیسم (منبع Bard, 2000)

-
- ^{۱۰} Uridine Diphosphoglucose
^{۱۱} Uridine-diphosphate-glucuronic acid
^{۱۲} 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate
^{۱۳} Glutathione S Transferase(GST)

۲-۱-۲ آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز:

این آنزیم یکی از مهم ترین آنزیم های درون سلولی مربوط به فاز دوم متابولیسم آلاینده های آلی محسوب می گردد. وظیفه اصلی این آنزیم کاتالاز واکنش کونژوگه شدن تری پتید گلوکاتایون به متابولیت های حاصل از فاز اول متابولیسم و یا آلاینده است.

از دیگر کارکرد های این آنزیم می توان به نقش آن در متابولیسم بیومولکول هایی نظیر پروستاگلاندین و استروئید، به عنوان انتقال دهنده درون سلولی در متابولیسم بیلروبین اشاره کرد. آنزیم گلوکاتایون اس- ترانسفراز در انواع مختلف جانداران نظیر باکتری ها، گیاهان و جانوران شناسایی شده است. نام گذاری آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز بر اساس هسته های کربن سوبستراها و یا گروه های کارکردی که منجر به تحریک و بروز آن می گردند صورت می گیرد. به عنوان مثال اسامی همانند گلوکاتایون اس آلکیل ترانسفراز، گلوکاتایون اس آریل ترانسفراز، گلوکاتایون اس اپوکساید ترانسفراز، گلوکاتایون اس آلکن ترانسفراز. این آنزیم بر اساس توالی اسید های آمینه و یا نوکلئوتید ها و ویژگی های ساختاری و ایمنولوژیک آن به ایزوفرم های مختلف تقسیم بندی می شود (Bard, 2000). بر اساس محل قرار گیری درون سلول، این آنزیم به دو نوع سیتوزولیک و میکروزومال تقسیم بندی می گردد. گلوکاتایون اس ترانسفراز سیتوزولیک یک پروتئین دوسویه^{۱۴} است که از دو بخش به نام های هتروداایمر^{۱۵} و همودایمر^{۱۶} تشکیل شده است. وزن مولکولی این نوع از آنزیم در حدود ۲۵kDa است. هر بخش دارای یک سایت فعال است که در هر سایت دو بخش به نام های G-site و H-site با کارکرد های متفاوت وجود دارد. بخش G-site در میان تمامی ایزوفرم های آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز به میزان فراوانی وجود دارد، در حالی که میزان بخش H-site در ایزوفرم های مختلف متفاوت است. این تغییر در ساختار ایزوفرم های مختلف آنزیم گلوکاتایون اس- ترانسفراز منجر به اعطای توانایی کونژوگه کردن طیف گسترده تری از مواد آلاینده می شود.

گلوکاتایون اس ترانسفراز میکروزومال نسبت به فرم سیتوزولیک دارای وزن مولکولی کمتر (۱۶-۱۸ kDa) است و از جمله پروتئین های متصل به غشا محسوب می گردد. محل قرار گیری این آنزیم در غشا شبکه آندوپلاسمی است یعنی جایی که محل قرارگیری آنزیم سیتوکروم اکسیداز و تجمع آلاینده های چربی دوست یا متابولیت های آنان است. این فرم از آنزیم نسبت به نوع سیتوزولیک آن دارای فعالیت و اثرگذاری بیشتری در فاز دوم متابولیسم آلاینده های آلی می باشد. نحوه عملکرد آنزیم گلوکاتایون اس- ترانسفراز بدین صورت است که گلوکاتایون به محل G-site و متابولیت به محل H-site این آنزیم متصل

^{۱۴} Dimeric
^{۱۵} Heterodimer
^{۱۶} Homodimer

می گردد که این امر سبب می شود تا در نزدیکترین مکان در مجاورت یکدیگر قرار گیرند. همزمان با این مرحله گروه های SH در گلوپروتئین نیز فعال می شوند که منجر به ایجاد پیوند بین اسید آمینه سیتئین و قسمت های آب دوست متابولیت می شود که در نهایت منجر به تشکیل ماده ای با فعالیت کمتر و حلالیت بیشتر در آب می گردد. آنزیم گلوپروتئین اس ترانسفراز در گونه های مختلف ماهی به میزان گسترده ای به عنوان نشانگر زیستی عوامل آلاینده نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مورد استفاده قرار گرفته است (Slatinskf *et al.*, 2008 ;Sen and Kirikbakan, 2004 ;Rudneva *et al.*, 2010). در این بررسی استفاده از این آنزیم در بافت کبد ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* به عنوان نشانگر زیستی آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مورد مطالعه قرار گرفته است.

۲-۳ لیزوزوم

هر سلول یوکاریوتی دارای گروهی از اندامک های سیتوپلاسمی به نام لیزوزوم است که عمل اصلی آن ها گوارش درون و برون سلولی است. لیزوزوم ها در سلول های گیاهی، جانوری و تک سلولی ها به جز باکتری ها وجود دارند. لیزوزوم ها کیسه های محتوی آنزیم های هیدرولاز اسیدی هستند که در حکم کیسه های خودکشی و یا نارنجک درون سلولی محسوب می شوند، تخریب غشای آنها می تواند موجب تجزیه مواد و اجزای درون سلول شود.

۲-۳-۱ نقش های لیزوزوم

از مهم ترین نقش های لیزوزوم در سلول می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- گوارش درون سلولی: مواد گوناگون به روش های فاگوسیتوزی و اتوفاژی به لیزوزوم ها می رسند. گوارش آن ها توسط آنزیم های لیزوزومی صورت می گیرد و مواد حاصل از گوارش با عبور از غشای لیزوزوم به سیتوزول می رسند و مسیر سوخت و ساز خود را می گذرانند (Luzio, 2007).
- گوارش برون سلولی: برای مثال سلول های استخوان خوار (استئوکلاست ها) که در مغز زرد استخوان قرار دارند با آزاد کردن هیدرولازهای لیزوزومی موجب تخریب سلول های استخوانی می شوند. این اندامک در تمایز سلولی، از بین بردن اندامک ها و در پدیده اتولیز نیز دخالت می کند (Luzio, 2007).

- دخالت در ایمنی سلول ها: لیزوزوم ها باکتری ها و ویروس های وارد شده به سلول را توسط آنزیم های خود تخریب کرده و از بین می برد (Luzio, 2007).
- تجمع مواد سمی (Luzio, 2007).

۲-۳-۲ آنزیم های لیزوزومی

به طور کلی آنزیم های لیزوزومی ساختمان گلیکوپروتئینی و عمل هیدرولازی دارند. این آنزیم ها در pH اسیدی فعالند. در لیزوزوم انواع مختلفی از آنزیم های هیدرولازی وجود دارند که تعدادی از آن ها عبارتند از: آنزیم های هیدرولیز کننده پروتئین ها شامل پروتئاز و پپتیدازها (کاتپسین، گلوتامات کربوکسیلاز و کربوکسی پپتیداز C، B، A)، آنزیم های اثر گذار بر روی مواد قندی شامل گلوکیدازها (آنزیم آلفا و ۴- گلوکزیداز، بتا- گلوکورونیداز، آریل سولفاتاز A و B، بتا- گالاکتورونیداز و آلفا مانوزیداز)، آنزیم های هیدرولیز کننده لیپیدها مانند استرازها و فسفولیپازها، آنزیم های هیدرولیز کننده اسیدهای نوکلئیک مانند DNase و RNase، فسفاتازها مثل اسید فسفاتاز، فسفودی استراز، فسفاتیدیک اسید فسفاتاز (Luzio, 2007).

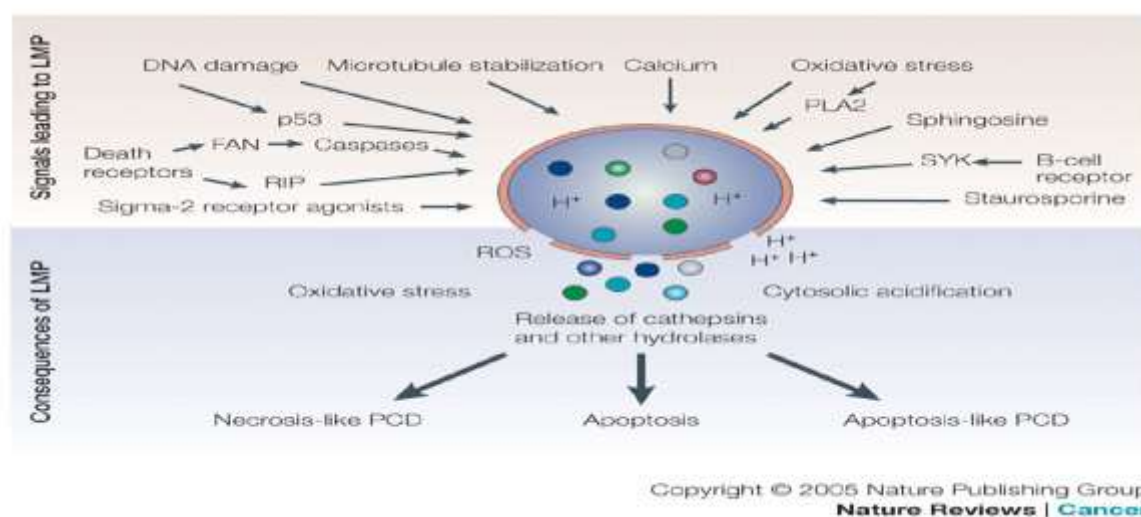
۲-۳-۳ ساختار غشاء لیزوزوم

غشاء لیزوزوم شبیه غشاء پلاسمایی است ولی به دلیل زیاد بودن لیپیدهای غشایی قابلیت تلفیق با غشاهای دیگر از جمله وزیکول های آندوسیتوزی را دارد. گلیکوپروتئین و لیستین به مقدار زیاد در این غشاء وجود دارد. این پروتئین ها به شدت گلیکوزیله شده اند و بطور قابل توجهی در مقابل تجزیه توسط هیدرولازهای اسیدی لیزوزوم مقاومند و لیزوزوم ها را به صورت یک مجموعه بسته نگه می دارند. در غشای لیزوزوم پمپ های پروتئینی وابسته به ATP وجود دارند که با مصرف انرژی، پروتون (H^+) را وارد لیزوزوم کرده و محیط اسیدی با pH حدود ۴/۵ تا ۵ را ایجاد می کنند، بدین طریق شرایط اسیدی برای فعالیت آنزیم های هیدرولازی لیزوزوم فراهم می شود. از طرف دیگر زیاد بودن تراکم یون های H^+ در مجاورت سطح درونی غشای لیزوزوم منجر به کاهش شدید pH (حدود ۲) می گردد. این pH پایین تر از pH مناسب برای فعالیت آنزیم های هیدرولاز لیزوزومی (حدود ۴/۵ تا ۵) است. این مسئله سبب می گردد تا آنزیم های هیدرولاز لیزوزوم بر روی غشا خود تاثیر گذار نباشند. یون ها هم در این عمل محافظتی نقش دارند (Geral, 2010). با این حال غشاء لیزوزوم بوسیله آنزیم های درون آن تا حدی گوارش می یابد ولی غشاء بطور دائم ترمیم می شود، این عمل نیاز به انرژی زیاد دارد و از آن جایی سلول مرده نمی تواند انرژی

را تامین کند در نتیجه آنزیم‌های هیدرولازی درون لیزوزوم آزاد شده و سبب از بین رفتن اندامک‌ها و خود سلول می‌شوند (Geral, 2010).

۲-۳-۴ عوامل تاثیرگذار و مخرب غشاء لیزوزوم

عوامل مختلفی سلامت و تمامیت غشاء لیزوزوم را در معرض خطر قرار داده و یا از بین می‌برند. از جمله این اینها می‌توان به عوامل مکانیکی (ضربه، لغزش‌ها، ارتعاشات و صوت‌های موسیقی)، عوامل فیزیکی (گرما و سرمای بیش از حد، انجماد و گرم کردن مجدد)، عوامل صوتی (رعد و برق، امواج ناشی از شکست دیوار صوتی)، عوامل هورمونی (هورمون‌های جنسی یا استروئیدها)، ویتامین‌های قابل حل در چربی (A، D، E و K)، عده‌ای از آنتی بیوتیک‌ها، برخی آنزیم‌های تجزیه‌کننده و در نهایت عوامل شیمیایی (افزایش CO_2 ، اکسیژن یونی، سیلیس، قلع و روی، سموم و آلاینده‌های آلی نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای) از جمله عوامل مخرب غشاء لیزوزوم محسوب می‌گردند. عوامل دیگری نظیر ویروس‌ها، تنش و شوک نیز از جمله عوامل مخرب غشاء لیزوزوم هستند (Camus *et al.*, 2000; Dailianis *et al.*, 2003; Martínez-Gómez *et al.*, 2006). شکل ۲-۳-۴-۳ تخریب غشاء لیزوزوم بر اثر عوامل آلاینده را نشان می‌دهد. با این وجود برخی مواد نظیر هورمون کورتیزول نقش پایدارکننده غشاء لیزوزوم را دارند. اکسیژن کافی و تغذیه مناسب نیز از عوامل پایدارکننده غشاء لیزوزوم محسوب می‌گردد (Geral, 2010).



شکل ۱-۳-۴ تخریب لیزوزوم بر اثر عوامل آلاینده (Kroemer and Jäätelä, 2005)

۲-۳-۵ تغییرات غشاء لیزوزوم به عنوان نشانگر زیستی

همان طور که ذکر گردید لیزوزوم به عنوان مقصد نهایی عوامل بسیاری از عوامل آلاینده محسوب می گردد. قسمت های مختلف لیزوزوم نسبت به ورود آلاینده حساس بوده و واکنش نشان می دهند. یکی از تغییرات مشخص و بارز، افزایش تردی و ناپایداری غشاء لیزوزوم است (Martínez-Gómez *et al.*, 2006). آسیب به غشاء لیزوزوم می تواند موجب رهاسازی محتویات آن به درون سیتوزول گردد که این امر در نهایت ساختار و عملکرد سلول تاثیر گذار است. از این رو پایداری غشاء لیزوزوم از شاخص های مناسب در تعیین سطح سلامت و یا آسیب سلول محسوب می گردد. این تغییرات در سطح درون سلولی را می توان به عنوان نشانگرهای اولیه زیستی از ورود عوامل آلاینده در نظر گرفت (Dailianis *et al.*, 2003; Domouhtsidou *et al.*, 2001; Lowe (D.W.T, 2004). همکاران در سال ۱۹۹۲ روشی را تحت عنوان ^{۱۷} NRR time جهت تعیین میزان پایداری غشاء لیزوزوم بر اساس ظرفیت جذب، نگهداری و دفع ماده رنگی قرمز خنثی^{۱۸} توسط لیزوزوم معرفی کردند. در این روش تنها لیزوزوم هایی که در سلول های سالم قرار دارند ماده رنگی قرمز خنثی را حفظ می کنند. این روش میزان خروج محتوای لیزوزوم به درون سیتوزول را در موجوداتی که در معرض استرس و یا عوامل آلاینده قرار دارند نشان می دهد. این روش همچنین می تواند ظرفیت پروسه های سلولی را در سازگاری نسبت به عوامل استرس زا را نشان دهد (Dailianis *et al.*, 2003). این روش توسط محققین زیادی در بررسی میزان پایداری غشاء لیزوزوم در زمان قرار گیری موجودات آبی به ویژه بی مهرگان در معرض عوامل آلاینده نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مورد استفاده قرار گرفته است (Camus *et al.*, 2000; Bresler *et al.*, 1999; Dailianis *et al.*, 2001; Domouhtsidou *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2003). با این حال مطالعات کمی در گونه های مختلف ماهی تاکنون صورت گرفته است. از این رو مطالعه این تغییرات در گونه های مختلف آبزیان به ویژه ماهی و نسبت به عوامل آلاینده مختلف در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی مهم و ضروری می باشد. در این بررسی، میزان پایداری غشاء لیزوزوم در خون ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* به عنوان نشانگر زیستی آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است.

^{۱۷} Neutral Red Retention time
^{۱۸} Neutral Red Dye

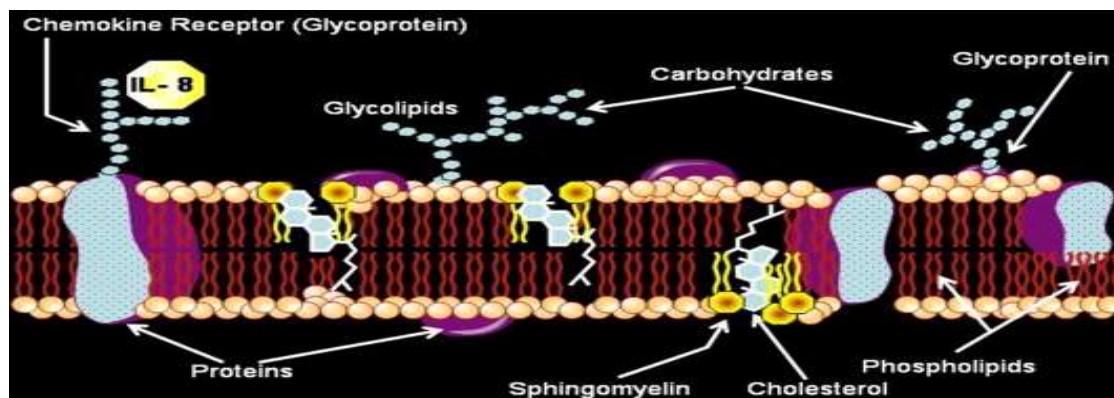
۲-۴ سلول گلبول قرمز خون

خون بافت پیوندی تخصص یافته ای است که سلولهای آن در داخل مایعی به نام پلاسما شناورند. مواد شیمیایی لازم برای زنده ماندن سلولها نظیر غذا، اکسیژن و املاح، مواد زائد تولید شده توسط سلولها، هورمون ها، عوامل شیمیایی تنظیم کننده، عوامل انعقادی و همچنین سلول های خونی در پلاسما می باشند. سلول های خون شامل گلبول سفید یا لوکوسیت ها و گلبول قرمز یا اریتروسیت ها هستند. گلبول قرمز یکی از فراوان ترین سلول های بدن ماهی محسوب می گردد (کمتر از ۳ میلیون عدد در هر میلی متر مکعب خون). گلبول های قرمز ماهیان هسته دار و معمولاً بیضی شکل و فقط در تعداد نسبتاً محدودی از گونه ها به صورت تقریباً کروی شکل دیده می شود. هسته آنها بیضی شکل و دارای دانه های کروماتینی است. سیتوپلاسم سلولهای بالغ به خاطر دارا بودن مقدار زیادی هموگلوبین، اسیدوفیلی می باشد. تعداد و اندازه گلبول های قرمز در گونه های مختلف ماهی ها تفاوت های قابل ملاحظه ای دارند. طول آن در ماهیان استخوانی از ۱۲ تا ۱۴ میکرون و عرض آنها از ۸/۵ تا ۹/۵ میکرون متغیر است. مقدار گلبول قرمز به میزان اکسیژن خواهی ماهی در مراحل مختلف زندگی، شرایط محیطی و ... بستگی دارد. معمولاً ارتباط معکوسی بین اندازه و تعداد گلبول های قرمز وجود دارد. گلبول های قرمز در بیشتر ماهیان عمدتاً در کلیه و طحال تولید می شوند معمولاً راس کلیه مهمترین محل تولید آنهاست. هموگلوبین برحسب فصل، دما، وضعیت غذایی و بهداشتی ماهی متفاوت است، با این حال در بعضی از گونه ها بیش از یک نوع هموگلوبین را می توان مشاهده کرد. تعداد محدودی از ماهیان نیز، فاقد هموگلوبین هستند.

۲-۴-۱ ساختار غشاء سلول گلبول قرمز

غشاء گلبول قرمز نقش مهم و کلیدی در تنظیم سیالیت، شکل پذیری، چسبندگی به دیگر سلول ها، ایمنی سلول، انتقال یون ها و مواد دیگر و انتقال گاز ها ایفا می کند. این عملکرد غشا وابستگی زیادی به موقعیت و ترکیب اجزا سازنده آن دارد. به طور کلی غشاء گلبول قرمز از سه لایه تشکیل شده است. لایه خارجی یا glycocalyx که دارای کربوهیدرات زیادی است. لایه میانی یا lipid bilayer که از انواع مختلفی از چربی ساخته شده است. در این لایه میزان زیادی پروتئین نیز وجود دارد. در کنار لایه چربی و اسکلت سلولی یک شبکه ساختاری از پروتئین به سطح داخلی (لایه درونی) غشاء متصل است (شکل ۲-۴-۱). بخش لپیدی غشاء گلبول قرمز از چربی هایی نظیر کلسترول و فسفولیپید ساخته شده است. بر خلاف کلسترول که بین لایه خارجی و داخلی پراکنده است، پنج نوع فسفولیپید غشاء به نام های فسفاتیدیل اتانول

آمین^{۱۹}، فسفاتیدیل کولین^{۲۰}، اسفنگومیلین^{۲۱}، فسفوااینوزیتول^{۲۲}، فسفاتیدیل سرین^{۲۳} به صورت غیر متقارن در غشاء پراکنده شده اند. پراکنش غیر متقارن آنها در نتیجه عملکرد پروتئین های وابسته و غیروابسته به انرژی به عنوان انتقال دهنده فسفولیپیدها است. پروتئین هایی به نام Filippases فسفولیپید را به لایه خارجی تر و پروتئین هایی تحت عنوان Filoppases فسفولیپید را به لایه داخلی تر انتقال می دهند. پروتئین هایی به نام Scramblase فسفولیپید ها را در دو جهت انتقال می دهند. وضعیت و موقعیت قرارگیری چربی های غشاء در بسیاری از ویژگی های فیزیکی آن نظیر نفوذپذیری، سیالیت، یکپارچگی و عملکرد آن اثرگذار می باشد. فعالیت بسیاری از پروتئین های غشاء نیز به واسطه برهم کنش بین چربی های غشاء صورت می گیرد. در حدود پنجاه نوع پروتئین غشایی شناسایی شده است که در گلبول قرمز انواع ماهیان چند صد هزار تا یک میلیون کپی از آنها می تواند وجود داشته باشد. پروتئین های غشاء در فرم دادن، انعطاف پذیری، انتقال یون و مولکول ها از خلال غشاء، چسبندگی و ارتباط با دیگر سلول ها به عنوان گیرنده و مقاومت گلبول قرمز نقش دارند. هر گونه نقصان در پروتئین ها می تواند بر ساختار اسکلت سلولی اثر گذار باشد. این تغییرات می تواند تغییر در شکل و یا میزان پایداری سلول باشد. پروتئین های غشایی گلبول قرمز بر اساس عملکرد خود به انواع پروتئین هایی نظیر kidd antigen Band3, Aquaporin1, BCAM, Na⁺/K⁺ATPase, Ca²⁺-ATPase, Na⁺K⁺2Cl⁻ cotrasporter, Na⁺Cl⁻ cotransporter, ICAM-4, Na-H exchanger, K-Cl cotransporter, Gardos channel همچنین انواع پروتئین هایی که نقش ساختاری دارند تقسیم بندی می گردد (Tziakas *et al.*, 2010).



شکل ۱-۴-۱ ساختار غشاء سلول گلبول قرمز خون (Tziakas *et al.*, 2010)

- Phosphatidylethanolamine (PE)^{۱۹}
- Phosphatidylcholine (PC)^{۲۰}
- Sphingomyelin (SM)^{۲۱}
- Phosphoinositol (PI)^{۲۲}
- Phosphatidylserine (PS)^{۲۳}

۱-۴-۲ تغییرات غشاء گلبول قرمز به عنوان نشانگر زیستی

میزان پارامترهای خون یکی از شاخص های منحصر به فرد گونه های جانوری است که آن را از سایر گونه ها متمایز می نماید. شاخص های خونی نه تنها به عنوان خصوصیت گونه ای مطرح هستند بلکه در بررسی سلامت گونه نیز می توانند مورد استفاده قرار می گیرند. پارامترهای خونی تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله نوع گونه، بیماری های عفونی، عوامل محیطی، عوامل استرس زا و آلاینده ها قرار می گیرند (Kubilay and Ulukoy, 2002; De Sme and Blust, 2001). ارزیابی پارامترهای خون در حیوانات یک ابزار متداول در مباحث تاکسیکولوژیک و بررسی اثرات آلاینده ها به حساب می آید و می تواند اطلاعات ضروری و مهمی را از وضعیت فیزیولوژیک آنها در اختیار ما قرار دهد. از آنجا که چنین تغییراتی طبیعتاً ناشی از تغییرات درونی و فیزیولوژیک بدن می باشد، لذا بررسی فاکتورهای خونی می تواند نقش مهمی در تعیین تغییرات متابولیسم و فیزیولوژیک بدن موجود ناشی از عوامل آلاینده باشد و همچنین نقش مهمی در شناخت و تلاش در به حداقل رساندن این آشفتگی فیزیولوژیک بدن ایفا می کند. اما در ماهی، ارزش به کارگیری آزمایشهای خون به دلیل فقدان اطلاعات پایه ای موثق و معتبر چندان آشکار نشده است. ضمن این که ارتباط بین بیماریها و عوامل آلاینده با تغییرات پاتولوژیک که پارامترهای خون را دستخوش تغییر می کند کاملاً اثبات نشده است (Mensinger *et al.*, 2005). از سوی دیگر اکثر مطالعاتی که تاکنون در زمینه فاکتور های خونی ماهی در زمان قرار گیری در معرض عوامل آلاینده صورت گرفته است در زمینه تغییر در تعداد سلول های خونی و یا تغییر در فاکتور های بیوشیمیایی سرم خون بوده است. با این حال مطالعه کمی بر روی غشاء سلول های گلبول قرمز گونه های مختلف ماهی در زمان قرار گیری در معرض عوامل آلاینده صورت گرفته است.

همان طور که در بخش قبل ذکر گردید گلبول قرمز به عنوان یکی از سلول های مهم خونی نقش مهمی در انتقال گازها، الکترولیت ها، تعادل اسید و باز ایفا می کند. انجام این وظایف که نقش مهمی در بقاء جانداران از جمله ماهی و حفظ تعادل فیزیولوژیک آنها دارد وابستگی زیادی به پایداری و تراوایی و عملکرد مطلوب اجزاء غشاء سلول های گلبول قرمز دارد. به همین دلیل عدم توانایی گلبول های قرمز در انجام وظایف خود ناشی از تأثیرات عوامل آلاینده بر میزان پایداری و تراوایی غشاء می تواند یکی از مهم ترین اثرات آلاینده ها محسوب گردد. از سوی دیگر غشاء گلبول قرمز به دلیل دارا بودن میزان زیاد چربی مقصد مناسبی برای آلاینده های چربی دوست محسوب می گردد. این عوامل، در کنار راحتی و سهولت در دستیابی و جداسازی سلول های گلبول قرمز، این سلول ها را مدل مناسبی برای مطالعه اثرات عوامل آلاینده به ویژه آلاینده های چربی دوست بر غشاهای زیستی قرار می دهد (Abdel-Raheem *et al.*, 2009). تأثیرات مستقیم و یا

غیر مستقیم عوامل آلاینده بر ساختار، پایداری و سیالیت غشاء سلول های گلبول قرمز خون ماهی در نهایت می تواند منجر به همولیز (تخریب یا شکسته شدن غشاء گلبول قرمز و آزاد شدن هموگلوبین به پلاسما خون) این سلول ها گردد. یکی از روش های کم هزینه ولی با کارایی بالا در کسب اطلاعات پیرامون ساختار و ترکیبات غشاء و تاثیر عوامل آلاینده بر آن تست میزان پایداری^{۲۴} غشاء گلبول قرمز است. در این تست میزان همولیز سلول های گلبول قرمز در حضور یک شیب غلظتی از نمک مورد بررسی قرار می گیرد. این تست در واقع توانایی غشاء سلول های گلبول قرمز خون را در حفظ میزان پایداری و قوام خود در برابر شوک اسمزی را مورد بررسی قرار می دهد. این میزان پایداری و قوام غشاء نسبت به شوک اسمزی در سلول های گلبول قرمز خون ماهیانی که در معرض عوامل آلاینده قرار داشته اند نسبت به سلول هایی که در محیط غیر آلوده قرار دارند کمتر است (Rodrigues *et al.*, 2011). از این رو این تست به میزان زیادی می تواند در ارزیابی میزان سمیت آلاینده ها در بدن موجودات نظیر ماهی مورد استفاده قرار گیرد (Barakat, 2005; El-Gawahir *et al.*, 2004; Nasuti *et al.*, 2003).

در این مطالعه از یک سو میزان پایداری و قوام سلول های گلبول قرمز ماهی گل خورک *B. dussumieri* در ایستگاه های مختلف نمونه برداری مورد بررسی قرار گرفته است. از سوی دیگر میزان تغییرات غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک *B. dussumieri* در شرایط آزمایشگاهی و در زمان قرارگیری در معرض غلظت های متفاوت شانزده ترکیب هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در زمان های مختلف مورد آنالیز و بررسی قرار گرفته است.

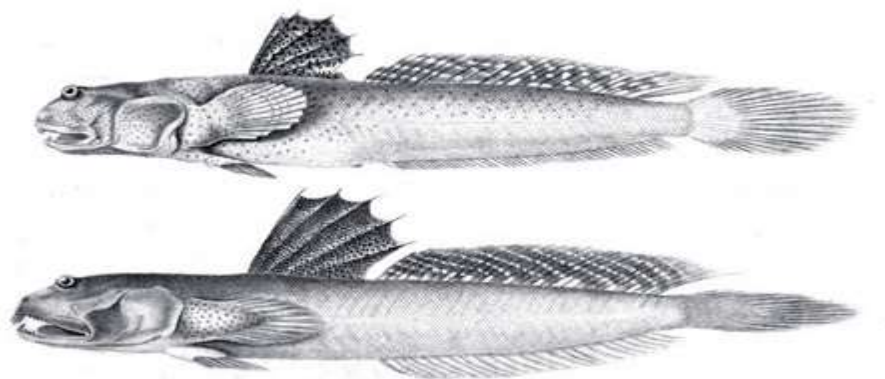
۲-۵ معرفی گونه مورد مطالعه:

ماهی گل خورک از رده ماهیان استخوانی و خانواده گاو ماهیان است. از این خانواده تا کنون تعداد ۲۱۲ جنس و حداقل ۱۹۵۰ گونه شناخته شده است که بعد از کپور ماهیان از بزرگترین خانواده ماهیان محسوب می گردند. این خانواده از ماهیان دو تنفسی می باشند که دارای ارزش اکولوژیک ویژه ای هستند (شکل ۲-۵-۵).

نام لاتین این ماهی (mudskipper) از ویژگی رفتاری منحصر به فرد آن گرفته شده است (mud در زبان لاتین به معنی گل و لجن و skipper هم به معنی جست و خیز کننده). گل خورک ماهیان به زندگی در سواحل گلی سازگاری یافته اند و شاخص بستر های گلی و جنگل های حرا محسوب می گردند. این ماهیان اغلب کفزی و ساکن آبهای کم عمق ساحلی و حاشیه مناطق جزر و مدی می باشند، ولی تا عمق دویست متر نیز گونه هایی از آنها جمع آوری شده است. بر خلاف اغلب ماهی ها که برای زنده ماندن

^{۲۴} Osmotic Fragility Test

درهنگام جزر، خود را در زیر جلبک های دریایی مرطوب و یا استخرهای جزر و مدی پنهان می کنند، گل خورک ها هنگامی که خارج از آب هستند جانورانی بسیار فعالند. گل خورک ها تنها ماهیانی اند که بیشتر فعالیت های عمده خود شامل تغذیه، فعالیت های جنسی و دفاع از قلمرو را روی خشکی انجام می دهند. این ماهیان از باله های سینه ای تغییر شکل یافته خود برای راه رفتن بر روی زمین استفاده می کنند. در برخی از انواع این ماهی، باله های شکمی هم به همین صورت تغییر پیدا کرده اند و در انواع دیگر، آنها به گونه ای تبدیل شده اند که به همه چیز می چسبند. از ویژگی های این ماهیان چشم های برجسته آنها است که برای دید در خارج از آب تغییر یافته در حالی که توانایی آنها برای دیدن در زیر آب کاهش می یابد. زیر هر چشم جانور محفظه ای پر از آب حاصل از چین خوردگی های پوستی وجود دارد که جهت مرطوب نگه داشتن چشم های ماهی در زمان خروج از آب استفاده می گردد. تنفس این ماهیان از طریق پوست، دهان، مخاط گلو و حلق است. البته فقط زمانی که ماهی گل خورک در یک محیط مرطوب قرار دارد این امکان تنفس برایش میسر است به همین خاطر این جانوران محدود به زندگی در محیط های مرطوبند و نیاز دارند که همواره خود را مرطوب نگه دارند. بعضی از ماهیان حتی در مواقعی که آب اطرافشان حاوی اکسیژن محلول به میزان کافی است، از هوا استفاده می کنند. یکی دیگر از سازگاری های مهم که به تنفس آنها هنگام خروج از آب کمک می کند اتاقک های آبششی بزرگ شده آن هاست جایی که حباب های هوا در آن محبوس می شوند. این اتاقک آبششی بزرگ در هنگام خروج ماهی از آب به شدت بسته شده و آبشش ها را مرطوب نگه می دارد و فعالیت آنها را آسانتر می کند. این ماهیان نقب های زیرزمینی عمیق در رسوبات نرم حفر می کنند. نقب ها علاوه بر استفاده شدن به عنوان پناهگاه همچنین می تواند به عنوان پرورشگاهی برای بزرگ کردن تخم ها نیز به کار رود (Polgar et al., 2010). گل خورک ها جزء غالب ترین لارو ماهیان (بیش از ۸۰ درصد) در خوریات استان خوزستان و سواحل جنوبی ایران محسوب می شوند (دهقان مدیسه، ۱۳۷۹) و زیستگاه مشترکی با بسیاری از گونه های تجاری در این مناطق دارند، از آنجاییکه این ماهیان در ایجاد حفره، رسوب گذاری، احیا مواد آلی بستر و چرخش مواد غذایی به لایه های بالایی آنها توسط پدیده آشفستگی زیستی^{۲۵} نقش موثری دارند، لذا حضور آنها به عنوان یک حلقه اتصال بسیار مهم در شبکه غذایی می توان مهم قلمداد نمود. ماهی گل خورک را به دلیل پراکنش گسترده، عدم توانایی جابجایی زیاد بین زیستگاه ها، نقش مهم در زنجیره غذایی، زندگی در اکوسیستم های انتقالی (نظیر سواحل) و حضور در رسوبات می توان به عنوان شاخص زیستی مناسبی از حضور عوامل آلاینده در اکوسیستم های آبی استفاده نمود (Clinton et al., 2009).



شکل ۲-۵-۵ تصویر ماهی گل خورک (*Boleophthalmus dussumieri*)

۲-۵-۱ طبقه بندی گونه *Boleophthalmus dussumieri* (Murdy, 1989 ; Polgar, 2010)

نام فارسی: گل خورک، بوشلمبو

نام انگلیسی: Mudskipper

Domain : Eukaryota

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Subphylum : Vertebrata

Superclass : Gnathostomata

Grade : Teleostomi

Class : Actinopterygii

Subclass : Neopterygii

Division : Teleostei

Subdivision : Euteleostei

Superorder : Acanthopterygii

Series : Percomorpha

Order : Perciformes

Suborder : Gobioidi

Family : Gobiidae

Genus : *Boleophthalmus*

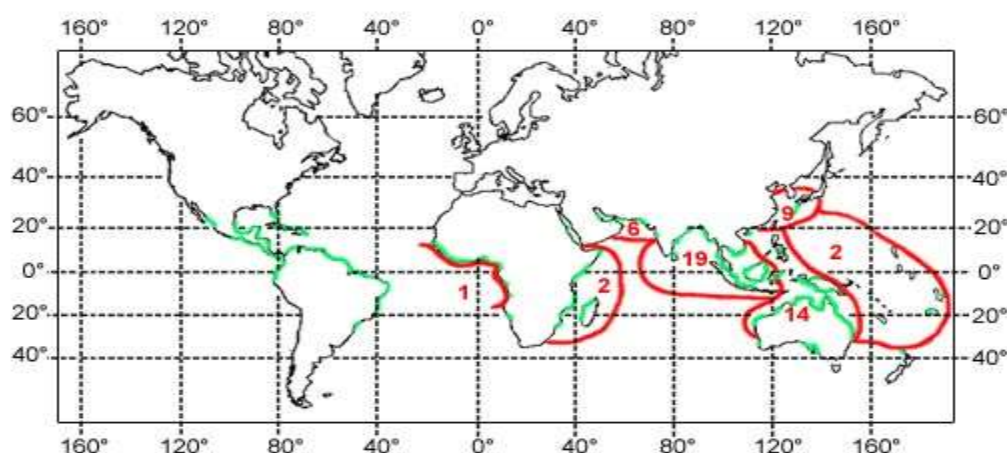
Species : *dussumieri*

۲-۵-۲ مورفولوژی:

خارهای اولین باله پشتی ۵-۴ عدد، خارهای دومین باله پشتی ۱ عدد و ۲۸-۲۴ شعاع نرم، خارهای باله منخرجی ۱ عدد، شعاع های باله منخرجی ۲۷-۲۳ عدد، شعاع های باله سینه ای ۲۰-۱۶ عدد. فلس ها بسیار کوچک و سیکلوئید، ۱۸۵-۱۰۳ عدد به صورت طولی و ۵۶-۴۸ عدد در پشت بدن. سه دندان نیشی در آرواره بالایی که در زمانی که دهان بسته است بیرون از آن قرار می گیرند، ۷۶-۳۹ دندان در آرواره بالایی و ۷۱-۴۳ دندان نیز در آرواره پایینی دارند که در آرواره پایینی به صورت صاف و مسطح قرار گرفته اند، تعداد دندان ها با افزایش سن زیاد می شود. خارهای آبششی در محفظه آبششی قرار دارند و در نمونه های موجود در آبهای ایران ۱۴-۱۲ عدد است. روده طویل و پیچ خورده است. بدن کشیده، فشرده و سری گرد دارند. اپیدرم پشت گردن و سر جهت جلوگیری از خشک شدن در زمان خروج از آب ضخیم است (Murdy, 1989 ;Polgar, 2010).

۲-۵-۳ پراکنش جهانی:

این گونه به عنوان یک گونه آمفی درومیک^{۲۶} به شمار می آید و از توانایی قابل ملاحظه ای برای ورود به آب شیرین، لب شور و شور برخوردار می باشد. از جمله ماهیان مناطق جزر و مدی و جنگل های حرا به شمار می آید. گستره پراکنش گل خورک ماهیان در جهان در مناطق جزر و مدی از از ژاپن تا هند شرقی، جزایر جنوب اقیانوس آرام در هند، آفریقای شرقی و استرالیا و همچنین جنگل های حرا از غرب آفریقا به سوی شرق تا پاپوآی گینه جدید است (Murdy, 1989 ;Polgar, 2010). در شکل ۲-۵-۳-۶ پراکنش جغرافیایی این ماهی در نقاط مختلف جهان نشان داده شده است.



شکل ۲-۵-۳-۶ پراکنش جغرافیایی جهانی ماهی گل خورک (*Boleophthalmus dussumieri*) [عکس برگرفته از (Murdy, 1989 ;Polgar, 2010)]

^{۲۶} Amphidromic

۲-۵-۴ پراکنش منطقه ای

در ایران گستره پراکنش آنها عمدتاً در پهنه های گلی مناطق گرمسیری و نواحی جزر و مدی و خوریات و جنگل های حرا خلیج فارس و دریای عمان شناخته شده است (Polgar, 2010).

۲-۵-۵ تغذیه

رژیم غذایی گل خورک عمدتاً از سخت پوستان، شکم پایان و همچنین از رژیم غذایی گیاه خواری تبعیت می کنند. اغلب رژیم غذایی متفاوتی دارند که از جلبک، مواد آلی در حال پوسیدگی و بی مهرگان کوچک و سخت پوستان تشکیل شده است. اما بعضی از گونه ها شکارگر بوده و عمدتاً از ماهی تغذیه می نمایند (Murdy, 1989 ; Polgar, 2010).

۲-۵-۶ تولید مثل:

تعیین جنسیت در این ماهی به راحتی بر اساس شکل ماهیان نر و ماده امکان پذیر نمی باشد اما به طور کلی جنس نر دارای باله پشتی بلند تر و دندان های نیش بزرگ تری است. زمان تخم ریزی این ماهیان در نقاط مختلف متفاوت است. به عنوان مثال در اکوسیستم های آبی عراق تخم ریزی در تیر ماه صورت می گیرد. در سواحل پاکستان نر ها در اندازه ۶۹ میلی متری و ماده ها در اندازه ۷۲ میلی متری بالغ شده و تخم ریزی دوبار در سال در اوایل بهار و اواخر تابستان صورت می گیرد. میزان هم آوری این گونه بین ۴۹۱۲-۹۸۶ تخم برای ماهیان به اندازه ۱۱۰-۷۴ میلی متر است و قطر تخم حداکثر ۱/۰۵ میلی متر است. در زمان جفت گیری ماهیان نر برای یافتن جفت از قلمرو خود خارج شده و رقابت جفت یابی برای کسب ماهیان ماده مجاور صورت می گیرد. ماهیان در زمان جفت یابی اغلب باله های پشتی و سینه ای و دهان خود را بازمی کنند. پس از اینکه ماهی نر در رقابت جفت یابی پیروز شد، جفت خود را به درون نقب برده و در آنجا جفت گیری صورت می گیرد (Murdy, 1989 ; Polgar, 2010).

۲-۶ پیشینه تحقیق در ایران و جهان

مکانیسم های بروز سمیت از یک سو و مکانیسم های سمیت زدایی و کاهش خطرات و آسیب های در معرض قرارگیری از سوی دیگر از موارد ارزشمند در مباحث تاکسیکولوژی محسوب می گردند که می تواند نقش بسیار مهمی در نشان دادن اثرات آلاینده بر ارگانیسم های آبی، توسعه نشانگر های زیستی در طرح های پایش زیست محیطی ایفا کند. با این حال، تحقیقات و مطالعات کمی در مورد تغییرات سیستم های فیزیولوژیک آبزیان پس از قرار گیری در معرض عوامل آلاینده به ویژه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای صورت گرفته است. در خلیج فارس، بیشتر تحقیقات تاکسیکولوژیک در زمینه

آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ماهیان به ویژه پس از جنگ ایران و عراق انجام گردیده است. بیشتر تحقیقات به بررسی تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت های مختلف آبزیان محدود شده است و مطالعات کمی در زمینه پاسخ های فیزیولوژیک ماهیان پس از قرار گیری در معرض آلاینده ها به ویژه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در شرایط محیط طبیعی و آزمایشگاهی صورت گرفته است. در ماهی گل خورک گونه *Boleophthalmus dussumieri* تاکنون مطالعه ای در این زمینه صورت نگرفته است. ذیلا به برخی از مطالعات مرتبط صورت گرفته با تحقیق حاضر در نقاط مختلف جهان اشاره می نمایم:

- Martínez-Gómez همکاران در سال ۲۰۰۷ میزان NRR time را به عنوان بیومارکر آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ماهی (*Mullus barbatus*) بررسی کردند.
- Havelková و همکاران در سال ۲۰۰۸ امکان سنجی استفاده از بیومارکرهای مختلف در ارزیابی بیولوژیک اثرات آلاینده های آلی بررسی کردند.
- Van der Oost و همکاران در سال ۲۰۰۳ تجمع زیستی آلاینده ها در ماهیان و استفاده از نشانگر های زیستی در ارزیابی اثرات آنها را مورد بررسی و مطالعه قرار دادند.
- D.W.T. Au. در سال ۲۰۰۴ استفاده از نشانگر های زیستی در پایش آلودگی اکوسیستم های دریایی را مورد بررسی قرار داد.
- WEIS در سال ۲۰۰۲ جمعیت زیاد ماهی *Fundulus heteroclitus* را در منطقه با آلودگی بالا گزارش کرد که طی بررسی ها میزان زیاد فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز را با توانایی بالای جمعیت ماهی جهت زیستن در محیط آلوده شناسایی کرد.
- Stephensen و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعات خود میزان بالای فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس- ترانسفراز را در مناطق آلوده به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در مقایسه با مناطق رفرنس و غیر آلوده بافت کبد ماهی (*Myoxocephalus scorpius*) گزارش کردند.
- Carney Almroth در سال ۲۰۰۸ آسیب های اکسید کننده نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در گونه ماهی و برخی بیومارکر ها نظیر آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز را مورد بررسی قرار داد که طی مطالعات خود آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز را به عنوان بیومارکر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در محیط آزمایشگاهی و طبیعی را پیشنهاد کرد.
- Klumpp و همکاران در سال ۲۰۰۲ میزان تجمع هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و اثرات بیولوژیک آن بر ماهی را بررسی کردند که در مطالعات خود میزان تولید بالای آنزیم گلوکوتایون اس-

ترانسفراز را به عنوان یک آنزیم مهم در پروسه سمیت زدایی و دفع آلاینده و همچنین بیومارکر آلاینده معرفی کردند.

• Jones و همکاران در سال ۱۹۹۵ نقش سمیت زدایی گلوکاتایون را در برابر آلاینده ها در ماهی بررسی کردند که در مطالعات خود نقش آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز را در متابولیسم هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بدن ماهی در جهت افزایش چربی گریزی و آب دوست شدن آلاینده و کمک به دفع و سمیت زدایی آن را بررسی و تایید کردند.

• Aas و همکاران در سال ۲۰۰۶ میزان تجمع و آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و برخی پاسخ های فیزیولوژیک نظیر آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز به عنوان بخشی از متابولیسم آلاینده در بدن را در ماهی Atlantic (*Gadus morhua*) Cod بررسی و مطالعه کردند که طی مطالعات خود استفاده از این آنزیم را به عنوان پاسخ فیزیولوژیک ماهی به آلاینده و بیومارکر آن تایید نمودند.

• Danischewski و همکاران در سال ۲۰۰۶ میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز را در ماهی کاد *Gadus morhua* به عنوان بیومارکر برخی آلاینده های آلی نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بررسی و تایید کردند.

• Martínez-Gómez و همکاران در سال ۲۰۰۶ مجموعه ای از بیومارکرها نظیر NRR time, آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز را در ماهی (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) در برابر حضور برخی آلاینده ها نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بررسی کردند که طی مطالعات خود استفاده از این پاسخ های فیزیولوژیک را به عنوان بیومارکر تایید نمودند.

• Amado و همکاران در سال ۲۰۰۶ پاسخ بیومارکرها نظیر آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز، NRR time را نسبت به عوامل آلاینده نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ماهی (*Paralichthys* Brazilian flounder (*orbignyanus*) بررسی و مطالعه کردند که مطالعات آنها استفاده از این موارد را به عنوان بیومارکر حضور و اثر آلاینده تایید کردند.

• Henson و همکاران در سال ۲۰۰۱ تحریک فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز را پس از قرار گیری در معرض آلاینده در ماهی brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) بررسی کردند.

• Pandey و همکاران در سال ۲۰۰۳ برخی نشانگرهای زیستی استرس های اکسیداتیو نظیر آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز را در ماهی *Wallago attu* مورد مطالعه و بررسی قرار دادند.

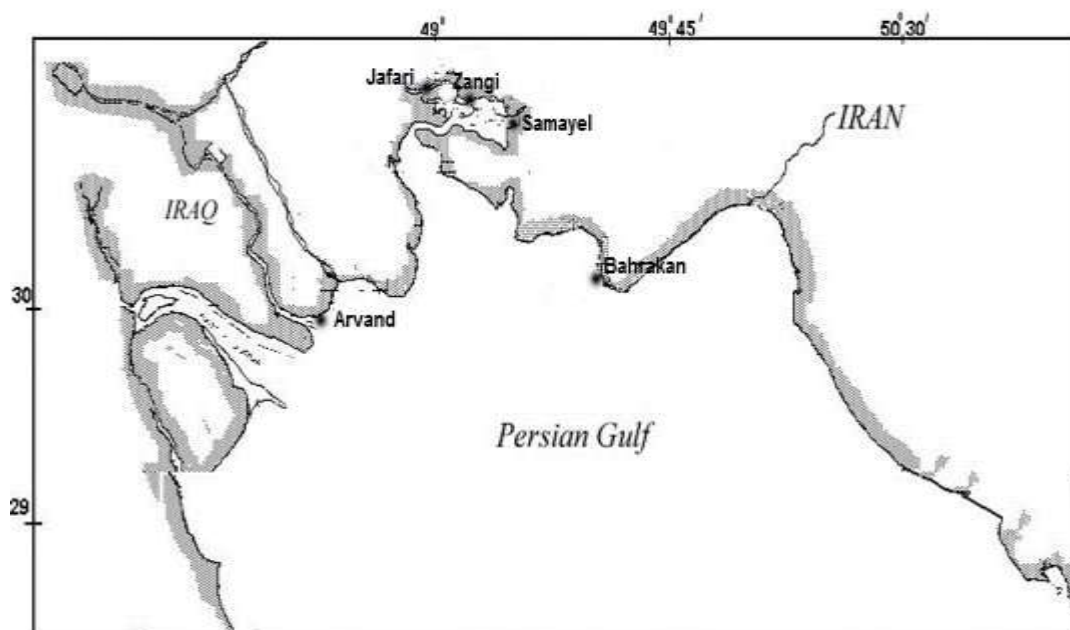
• Rudneva و همکاران در سال ۲۰۱۰ فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز را در گونه های مختلف ماهی در دریای سیاه را بررسی و مطالعه کردند.

- Sen and Kirikbakan در سال ۲۰۰۴ ویژگی های بیوشیمیایی و پراکنش آنزیم گلوکاتیون اس- ترانسفراز را در ماهی *Liza saliens* بررسی کرد.
- Broeg و همکاران در سال ۲۰۰۲ میزان پایداری غشاء لیزوزوم را در ماهی *Platichthys flesus* به عنوان نشانگر زیستی در ارزیابی اثرات آلاینده بررسی کردند.
- Kohler و همکاران در سال ۲۰۰۲ استفاده از پایداری غشاء لیزوزوم را به عنوان نشانگر زیستی در برخی گونه های ماهی نظیر *Platichthys flesus* مورد بررسی و مطالعه قرار دادند.
- Aldrich and Saunders در سال ۲۰۰۰ میزان پایداری غشاء گلبول قرمز جانداران خونسرد و خونگرم را مقایسه و بررسی کرد.
- Bekatas and Ayik در سال ۲۰۱۰ میزان پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی *Oncorhynchus mykiss* را پس از قرار گیری در معرض *Aeromonas salmonicida* مورد بررسی و مطالعه قرار داد.
- Rodrigues و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر سم رانداپ را بر میزان پایداری غشاء گلبول قرمز بررسی و مطالعه کردند.
- Seibert و همکاران در سال ۲۰۰۱ میزان پایداری غشاء گلبول قرمز را در ماهی *Colossoma macropomum* مورد بررسی و مطالعه قرار دادند.
- Barakat در سال ۲۰۰۵ تاثیر برخی آلاینده های آلی نظیر حشره کش ها را بر میزان پایداری غشاء گلبول قرمز خون ماهی مورد بررسی قرار داد.

فصل سوم : روش اجرای تحقیق

۱-۳ محل و زمان انجام تحقیق:

مراحل اجرایی این پروژه از تیر ماه ۱۳۸۹ تا آذر ماه ۱۳۹۰ صورت پذیرفت. نمونه برداری از پنج ایستگاه واقع در سواحل شمال غرب خلیج فارس (سواحل خوزستان) انجام گردید (شکل ۳-۱-۷). موقعیت جغرافیایی و دلایل انتخاب ایستگاهها در جدول ۳-۱-۳ نشان داده شده است. در انجام این تحقیق از مساعدت و همکاری مرکز ملی اقیانوس شناسی ایران بهره گرفته شد.



شکل ۳-۱-۷ موقعیت ایستگاه های نمونه برداری

جدول ۳-۱-۳ موقعیت ایستگاههای نمونه برداری در شمال غرب خلیج فارس

ایستگاه نمونه برداری	موقعیت		دلیل انتخاب
	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	
اروند (St1)	۴۸° ۴۰' ۵۸" E	۲۹° ۵۴' ۳۵" N	پالایشگاه آبادان
جعفری (St2)	۴۹° ۰۶' ۵۲" E	۳۰° ۲۶' ۵۲" N	منطقه ویژه اقتصادی، نفتی و صنایع پتروشیمی
زنگی (St3)	۴۹° ۰۳' ۵۲" E	۳۰° ۲۸' ۵۲" N	صنایع پتروشیمی، بندرگاه
سمایی (St4)	۴۹° ۱۰' ۵۱" E	۳۰° ۲۷' ۴۵" N	بندرگاه و اسکله شناور های صیادی، مخازن ذخیره نفتی
بحرکان (St5)	۴۹° ۵۰' ۵۴" E	۳۰° ۰۸' ۱۴" N	ایستگاه شاهد

۲-۳ مواد و وسایل

مواد و وسایل به دو بخش مواد مصرفی و غیر مصرفی تقسیم بندی شده است.

۱-۲-۳ مواد و وسایل مصرفی

از مهم ترین مواد و وسایل مصرفی می توان به پودر آلومینا، استونیتریل، هپارین، سیکلو هگزان، کاغذ صافی، آب مقطر دیونیزه، میکرو تیوب، قوطی های فلزی جهت نگهداری نمونه های رسوب، سرنگ یک میلی لیتری، عصاره گل میخک، دی کلرو متان، ان هگزان، هیدروکسید پتاسیم، هیدروکسید سدیم، سولفات منیزوم، کلرید پتاسیم، کلرید کلسیم، دی متیل سولفوکساید، بافر سدیم فسفات، فسفات هیدروژن سدیم، پودر^{۲۷} NR،^{۲۸} CDNB،^{۲۹} GSH و^۴ اشاره کرد.

۲-۲-۳ مواد و وسایل غیر مصرفی

از مهم ترین مواد و وسایل غیر مصرفی می توان به شوری سنج، دما سنج، pH متر، GPS، قایق موتوری، دستگاه هواده، نقشه های دریایی، جدول جزر و مد روزانه، یخدان، تور پرتابی، ساچوک، دستگاه فریز درایر، دستگاه روتاری، دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (AAS)، ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم، وسایل و ابزار آزمایشگاهی از قبیل هاون شیشه ای، بالن گرد، مبرد، قیف، پتری دیش، بالن ژوژه و، دستگاه ساتریفیوژ یخچال دار، همزن، میکروسمپلر، دستگاه HPLC^{۳۰} و شیکر اشاره کرد.

^{۲۷} Neutral red
^{۲۸} 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene
^{۲۹} Reduced glutathione
^۴ High Performance Liquid Chromatography

۳-۳ گونه مورد آزمایش

ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* به عنوان گونه اصلی و مورد نظر جهت بررسی آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و پاسخ های فیزیولوژیک ماهی به آن ترکیبات، انتخاب شد.

۳-۴ مراحل اجرایی

مراحل اجرایی به دو بخش عملیات میدانی و عملیات آزمایشگاهی تفکیک گردید.

۳-۴-۱ عملیات میدانی

پیش از شروع عملیات میدانی اطلاعات موجود در مورد سواحل خوزستان شامل نقشه های دریایی، نقشه های آب و هوایی، جدول جزر و مد روزانه مربوط به روزهای نمونه برداری و اطلاعات محلی در حد امکان جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به این اطلاعات نقاط قوت و ضعف شناسایی و مواردی که می بایست در قسمت عملیات میدانی لحاظ گردد مد نظر قرار داده شد.

نمونه برداری از ماهیان نظر به ویژگی های خاص ماهیان گل خورک و نیز با توجه به اینکه می بایست ماهیان به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل می شدند، به چند روش و با حداقل آسیب و استرس به ماهی صورت گرفت. ماهیان با استفاده از تور پرتابی، تور ساچوک، صید مستقیم به وسیله دست و یا روشن کردن چراغ در خلال شب (منجر به جمع شدن ماهی به اطراف چراغ شده که صید آنها را راحت تر می کند) در ایستگاه های نمونه برداری انجام شد. از هر ایستگاه تعداد ۵۰ عدد ماهی صید گردید. ماهی گل خورک درون تانک های ۳۰ لیتری و تحت شرایط درجه حرارت $25/2 \pm 0/7^{\circ}C$ و شوری ۳۸ ppt، ضمن هوادهی به آزمایشگاه منتقل گردید.

نمونه های رسوب از ۱۸ سانتی متر بالایی رسوبات و از سه نقطه در هر ایستگاه جمع آوری و در سینی استیل تمیز قرار گرفت. به وسیله یک قاشق تمیز مکعبی به عمق ۵ cm از سطح رسوب برداشته و در فویل های آلومینیومی پیچیده و برچسب گذاری شد. از هر ایستگاه تعداد پنج نمونه رسوب جمع آوری گردید. نمونه های رسوب در یخ تا آزمایشگاه حمل و در دمای $20^{\circ}C$ تا زمان سنجش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای نگهداری گردید. مراحل جمع آوری و نگهداری نمونه های رسوب تا زمان سنجش ترکیبات آلاینده مورد نظر بر اساس روش ICES, 1997 صورت گرفت. قابل ذکر است که نمونه های رسوب از همان محل صید ماهیان در ایستگاه های نمونه برداری جمع آوری گردید. در

هر ایستگاه به کمک دستگاه های شوری سنج و دما سنج فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل شوری و دما و pH اندازه گیری و ثبت گردید.

از سه نقطه در هر ایستگاه نمونه آب در بطری شیشه ای قهوه ای (حدود ۱۰۰۰ میلی لیتر) ریخته و نمونه های مورد آزمون در دمای تقریبی 4°C نگهداری گردید، همچنین تا زمان مرحله استخراج، نمونه ها از نور دور نگهداری شد. استخراج در عرض ۲۴ ساعت پس از نمونه برداری صورت گرفت تا از افت ناشی از جذب سطحی جلوگیری شود.

۳-۴-۲ عملیات آزمایشگاهی

در آزمایشگاه ماهیان توسط عصاره پودر گل میخک بیهوش و عملیات بیومتری جهت تعیین طول و وزن ماهیان صورت پذیرفت (میانگین طول $17 \pm 0.1\text{ cm}$ و میانگین وزن $16 \pm 0.2\text{ g}$). نمونه های خون ماهی جهت انجام آزمایشات بعدی از طریق ایجاد سوراخ در قلب ماهی گل خورک گرفته شد (شکل ۳-۴-۲-۸). قابل ذکر است که با این روش از یک سوا مکان آلودگی خون توسط سایر مایعات بدن ماهی کاهش می یابد که این خود در افزایش دقت و حساسیت آزمایشات بعدی تاثیر گذار است و از سوی دیگر امکان خونگیری و گرفتن خون به اندازه کافی و مورد نیاز توسط روش های مرسوم نظیر خونگیری از ساقه دمی در ماهیان کوچکی نظیر ماهی گل خورک میسر نمی باشد.

در این مرحله خون گیری توسط دو نمونه سرنگ صورت پذیرفت. در یک مرحله، خون توسط سرنگ های هپارینه به روش فوق گرفته و جهت سنجش میزان پایداری غشاء گلبول قرمز به میکروتیوب های هپارینه منتقل گردید. در مرحله دیگری، خون ماهی توسط سرنگ های که از قبل به میزان 0.1 میلی لیتر توسط سرم فیزیولوژیک پر شده بود گرفته و جهت سنجش میزان ثبات لیزوزومی به روش NRR time به لوله های میکروتیوب منتقل گردید.

بلافاصله پس از خونگیری، بافت های کبد و آبشش ماهی در روی یخ جدا و به دو بخش تقسیم گردید. بخشی از نمونه های بافت کبد و آبشش جهت سنجش میزان هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای جداسازی و در دمای 20°C تا زمان آنالیز نگهداری گردید. همچنین بخشی از بافت کبد ماهی جهت آنالیز میزان فعالیت آنزیم گلوکوتائین اس ترانسفراز در روی یخ جداسازی و در نیتروژن مایع فریز و در دمای 80°C - تا زمان آنالیز نگهداری گردید.

شاخص های زیستی مورفولوژیک نظیر 31 HSI و 32 CF نیز در ماهیان بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$HSI : (WH/WT) \times 100$$

$$CF : (WT/L^3) \times 100$$

که در آن WT: وزن کل (g); L: طول کل (cm) و WH: وزن کبد (g) می باشد (Sahan *et al.*, 2010)



شکل ۳-۴-۸ خونگیری از ماهی

31 Hepatosomatic Index
 32 Condition Factor

۳-۵ آنالیز هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

۳-۵-۱ شستشوی ظروف

کلیه ظروف و مواد برای سنجش هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مراحل شستشوی دقیقی را بشرح ذیل طی کردند. ظروف شیشه ای مورد استفاده از قبیل قیف های جدا کننده، فلاسک های حجم سنجی، بورت ها و بالن ها برای از بین بردن آلودگی های احتمالی ابتدا با محلول های شستشوی خانگی و آب شیر شسته شده و در ادامه با یک شیشه پاک کن به دقت تمیز گردیدند. سپس تمام ظروف با متانول و هگزان شستشو داده و در آن در دمای 200°C برای مدت یک شب قرار داده شد. پس از خنک شدن، تمامی ظروف به وسیله فویل آلومینیومی از پیش تمیز شده جهت جلوگیری از نفوذ غبار به شیشه بسته شد. جهت جلوگیری از ورود آلودگی از طریق فویل های آلومینیومی، این فویل ها به وسیله حلال هایی نظیر استون و هگزان شستشو گردید و در آن 200°C قرار داده شد. برای اطمینان از تمیز بودن مواد به کار برده شده از قبیل سولفات سدیم، هیدروکسید پتاسیم و ... آنها را در دستگاه سوکسله به همراه هگزان به مدت ۸ ساعت قرار داده شد و این عمل در ۸ ساعت دیگر با متانول انجام گردید.

۳-۵-۲ استخراج هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های بافت ماهی

جهت استخراج ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از نمونه های بافتی ماهی از روش توصیه شده توسط perugini و همکاران در سال ۲۰۰۷ استفاده گردید. میزان ۲ گرم از بافت کبد ماهی به همراه محلول KOH اتانولیک ۱ مولار به مدت ۳ ساعت در درجه حرارت 80°C درجه سانتیگراد درون سیستم رفلکس قرار داده شد. نمونه های هضم شده که به حالت شفاف رسیده است، وارد قیف جدا کننده شده و به آن ۱۰ میلی لیتر سیکلو هگزان اضافه گردید. قیف جدا کننده به مدت ۳۰ دقیقه بر روی دستگاه شیکر قرار داده و سپس به مدت ۵ دقیقه بر روی حلقه قرار گرفت تا فاز هگزانیک از فاز قطبی جدا شود. پس از جدا کردن فاز هگزانیک از فاز قطبی، مجدداً فاز قطبی دوبار دیگر توسط سیکلو هگزان شستشو داده شد. سپس نمونه ها از ستونی حاوی پودر سولفات سدیم انیدروس عبور داده شدند. ستون سپس توسط ۵ میلی لیتر سیکلو هگزان شستشو گردید. حجم نمونه ها توسط دستگاه تبخیر کن چرخان (مدل Buchi B-490) به ۵ میلی لیتر رسانده شد. در این مرحله دمای آب دستگاه روتاری حدود 30°C بود. نمونه ها سپس از ستونی حاوی پودر فلوریسیل عبور داده شده و سپس ستون در این مرحله توسط ۳ میلی لیتر سیکلو هگزان شستشو داده شد. حجم نمونه ها مجدداً توسط دستگاه تبخیر کن چرخان کاهش و

به حدود ۱ میلی لیتر رسانده شد. نمونه ها در مجاورت هوا خشک و ۱ میلی لیتر استونیتریل به آنها اضافه گردید. نمونه ها در این مرحله آماده تزریق به دستگاه HPLC گردیدند.

۳-۵-۳ استخراج هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب

جهت استخراج ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از نمونه های رسوب از روش توصیه شده توسط Moopam در سال ۱۹۹۹ استفاده گردید. نمونه های رسوبات در آزمایشگاه پس از حذف تکه های درشت و دور ریختن، درون دستگاه فریز درایر (مدل OPR-FDB-5503) قرار داده شدند. پس از ۴۸ ساعت نمونه های خشک شده به ظروف شیشه ای تمیز انتقال یافت. ۱۰ گرم از نمونه های فریز درای شده رسوب برداشته و به همراه مخلوط n-هگزان و دی کلرو متان با نسبت حجمی ۱:۱ به عنوان حلال درون سیستم سوکسله قرار داده شد. گرم کننده سوکسله را روشن کرده و اجازه داده شد تا استخراج در مدت زمان ۸ ساعت انجام شود. در این حالت نمونه های رسوب در استوانه های فلزی دستگاه سوکسله و حلال ها در بالن های سوکسله قرار داده شدند. سپس حجم حلال توسط دستگاه تبخیر کن چرخان در درجه حرارت کمتر از 30°C به ۱۵ میلی لیتر رسانده و با استفاده از مس فعال، گوگرد و ترکیبات آن از نمونه ها حذف و به مدت ۲۴ ساعت با کاغذ صافی (واتمن ۲۴ میکرون) صاف گردید. سپس نمونه ها مجدداً توسط دستگاه تبخیر کن چرخان تا حجم ۵ میلی لیتر تغلیظ گردید و از ستون حاوی پودر سیلیکا، پودر آلومینای آب زده و سولفات سدیم عبور داده شد. پیش از این مرحله، به منظور حذف هر گونه آلودگی ابتدا سیلیکا و آلومینا را هشت ساعت با هگزان و سپس هشت ساعت با متانول یا دی کلرو-متان سوکسله و در آن خشک شد. مواد فوق با قرار دادن در آن به مدت ۴ ساعت فعال و سپس با آب مقطر به مقدار ۵ درصد وزنی غیر فعال و در ظرف شیشه ای با درب محکم ریخته و خوب تکان داده شد. مواد به مدت یک شب تا رسیدن به تعادل قرار داده و سپس درون ظروف شیشه ای تمیز تیره رنگ تا زمان استفاده قرار گرفت. بعد از عبور نمونه ها از ستون فوق الذکر، مخلوط n-هگزان و دی کلرو متان به نسبت حجمی ۱:۹ به ستون اضافه گردید. حجم نمونه ها مجدداً توسط دستگاه تبخیر کن چرخان تا حد ۵ میلی لیتر رسانده شد. نمونه ها با کمک جریان گاز نیتروژن (مدل N-E VAP 112) با درجه خلوص ۹۹/۹۹٪ کاملاً خشک گردید. سپس ۱ میلی لیتر استونیتریل به نمونه ها اضافه گردید. نمونه ها در این مرحله آماده تزریق به دستگاه HPLC گردیدند.

۳-۵-۴ استخراج هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های آب

جهت استخراج ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از نمونه های آب از روش توصیه شده توسط Bashe و همکاران در سال ۱۹۹۰ و نیز ISO در سال ۲۰۰۲ استفاده گردید. نمونه مورد آزمون با یک هم زن مغناطیسی، یکنواخت گردید. سپس ۲۵ میلی لیتر هگزان به آن اضافه و با استفاده از همزن مغناطیسی با تنظیمات ۱۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه به هم زده شد. نمونه ها به قیف جدا کننده منتقل و اجازه داده شد تا در زمان حداقل ۵ دقیقه فازهای آب و هگزان از هم جدا شوند. فاز هگزان را به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد. قیف را با ۵ میلی لیتر هگزان شستشو داده و به مایع استخراجی اضافه گردید. فاز استخراج شده با سولفات سدیم به مدت حداقل ۳۰ دقیقه خشک گردید. فاز خشک شده به ظرف تغلیظ سرریز و ارلن را دو مرتبه با هگزان شستشو داده شد و به همان ظرف تغلیظ اضافه گردید. فاز هگزان خشک با استفاده از تبخیر کن چرخان که دمای حمام آن 30°C بود، تا جایی که فاز آلی فقط قسمت باریک ظرف تغلیظ را پر کند (حدود ۲ میلی لیتر) تبخیر گردید. به منظور خالص کردن مایع استخراجی، از ستون هایی حاوی حداقل ۰/۵ گرم سیلیکاژل استفاده گردید. مایع استخراجی را تا رسیدن به حجم 50 ± 50 میکرولیتر با جریان آرام گاز نیتروژن تغلیظ و استفاده از پیت روی سیلیکای پوشش داده شده با هگزان قرار داده و اجازه داده شد تا مایع استخراجی به طور کامل به داخل سیلیکا نفوذ کند. محلول حاصل از شستشو در ظرف شیشه ای جمع آوری گردید. بالن تغلیظ با ۵۰۰ میکرو لیتر هگزان شستشو داده و این محلول به ستون اضافه شد تا به طور کامل در سیلیکا نفوذ کند. سپس هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را با مخلوطی از دی کلرومتان/ هگزان به نسبت ۱ به ۱ شستشو گردید. ۲۵۰ میکرولیتر N_2N - دی متیل فرم آمید به محلول شویش اضافه و با تکان دادن همگن شده و تا حجم ۲۵۰ میکرولیتر تغلیظ گردید. برای این کار ابتدا با استفاده از تبخیرکن چرخان تا حجم ۲ میلی لیتر و سپس با استفاده از جریان گاز نیتروژن عمل تغلیظ صورت پذیرفت.

۳-۵-۵ سنجش ترکیبات استخراج شده ی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

جهت آنالیز میزان غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب و بافت ماهی از دستگاه HPLC مدل Hewlett-Packard 1100 استفاده گردید (شکل ۳-۵-۴-۹). تمام شرایط تزریق نمونه های بافتی ماهی شبیه نمونه های رسوب است با این تفاوت که در نمونه های بافتی از دتکتور های فلوروسانس به جای دتکتور UV استفاده گردید. فاز ساکن استفاده شده در دستگاه، ستون فاز معکوس C18 با طول ۲۵ سانتی متر ساخت شرکت SepServ بود. فاز متحرک از نوع گرادیانی که با ۴۰٪ آب و ۶۰٪ استونیتریل شروع شده و در مدت ۴۰ دقیقه به ۱۰۰٪ استونیتریل تغییر می یافت. شدت جریان فاز

متحرک ۰/۷ میلی لیتر بر دقیقه بود. میزان حد تشخیص دستگاه برای نمونه های بافتی $0.18-0.4 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ و برای نمونه های رسوب $0.5-1.4 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ و برای نمونه های آب $0.1-0.12 \text{ } \mu\text{g/l}$ بود. برای تنظیم دستگاه و تعیین غلظت ترکیبات مورد نظر از محلول استاندارد kit 610-N-Supelco 4-7351 محصول شرکت SUPLCO استفاده گردید. جهت تست کنترل کیفی در بین هر ده نمونه آزمایشی، یک نمونه محلول استاندارد (بلانک) توسط دستگاه آنالیز گردید.



شکل ۳-۴-۹ دستگاه HPLC مورد استفاده جهت آنالیز ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

۳-۶ سنجش آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز

آنالیز میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در نمونه های بافت کبد ماهی از روش توصیه شده توسط Habig و همکاران در سال ۱۹۷۴ و همچنین Rudneva و همکاران در سال ۲۰۱۰ استفاده گردید. میزان فعالیت آنزیم مربوط به ۳۰ نمونه ($n = 30$) بافتی در هر ایستگاه آنالیز گردید. پس از ذوب شدن، نمونه های بافت کبد توسط تیغه شیشه ای تمیز به قطعات ریز تبدیل گردیدند. سپس با اضافه کردن محلول بافر (phosphate buffer, pH ۶/۵) در هموژن کننده تفلونی با دور rpm ۱۰۰۰-۱۲۰۰ تا زمانی که کاملاً به صورت محلول در آید قرار گرفت. ماده هموژن شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C در دستگاه سانتیریوژ یخچال دار با دور $2400 \times g$ قرار گرفت. ماده شناور رویی جهت آنالیز میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در نمونه های مختلف به صورت زیر مورد استفاده قرار گرفت.

مخلوط واکنش شامل ۱/۵ میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار در pH ۶/۵، ۰/۲ میلی لیتر گلوتاتیون (GSH) ۹/۲ میلی مولار، ۰/۰۲ میلی لیتر CDNB ۰/۱ مولار و ۰/۱ میلی لیتر از ماده شناور رویی تهیه گردید. افزایش میزان جذب به دلیل تشکیل کونژوگه CDNB در حضور گلوتاتیون احیایی در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Model Specord 210, Germany) قرائت گردید. محلول واکنش بدون ماده هموژن حاوی کبد ماهی به عنوان بلانک استفاده گردید. میزان فعالیت آنزیم بر اساس نانومول (nmol) بر دقیقه در میلی گرم پروتئین بیان می گردد. میزان پروتئین با استفاده از سرم آلبومین انسان به عنوان استاندارد آنالیز گردید (Smith et al., 1985). میزان فعالیت آنزیم GST بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$1000 \times (E_{\text{exp}} - E_{\text{cont}}) \times 1.8$$

A: _____

$$9.6 \times v \times t \times c$$

که در آن:

E_{exp} : میزان جذب نمونه؛ E_{cont} : میزان جذب بلانک؛ 9.6: ثابت مولار کونژوگه؛ V: حجم نمونه؛ t: زمان؛ ۱۰۰۰: ضریب؛ 1.82: میزان حجم کل محلول؛ c: غلظت پروتئین؛ A: میزان فعالیت آنزیم.

۷-۳ آنالیز میزان تغییرات غشاء لیزوزوم توسط روش **NRR time**

سنجش میزان تغییرات در پایداری غشاء لیزوزوم در نمونه های خون ماهی گل خورک از روش توصیه شده توسط ICES در سال ۲۰۰۴ و همچنین UNEP/RAMOGGE در سال ۱۹۹۹ استفاده گردید.

قبل از خونگیری از ماهی محلول های مورد نیاز جهت انجام آزمایش به شرح زیر تهیه گردید. برای تهیه سرم فیزیولوژیک ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر را با ترکیبات ۲۰ mM Hepes (۴/۷۷ g), ۵۳ mM $MgSO_4$ (۱۳/۰۶ g), ۴۳۶ mM NaCl (۲۵/۴۸ g), ۱۰ mM KCl (۰/۷۵ g), ۱۰ mM $CaCl_2$ مخلوط و سپس به حجم ۱ لیتر رسانده و pH را بررسی و با 1M NaOH در حد ۷/۳۶ تنظیم گردید. جهت تهیه محلول ۱۰۰ mM NR از ۲۸/۸ میلی گرم از پودر را در ۱ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید^{۳۳} حل و در یخچال نگهداری گردید. هر بار که این محلول در دمای اتاق نگهداری می گردید pH آن کنترل می شد. سپس محلول کار با برداشتن ۱۰ میکرو لیتر از محلول استک و اضافه کردن با ۵ میلی لیتر از سرم فیزیولوژیک تهیه گردید. لازم به ذکر است که این محلول در عرض ۴ ساعت می تواند از بین برود، بنابراین تهیه این محلول در نزدیکترین زمان ممکن به خونگیری صورت گرفت.

در مرحله بعد سرنگ خون گیری به میزان ۰/۱ میلی لیتر توسط سرم فیزیولوژیک پر شد و سپس به میزان ۰/۱ میلی لیتر خون نیز از ماهی گرفته شد. محتویات سرنگ (مخلوط خون و سرم فیزیولوژیک) را به درون لوله های کوچک سانتیفریوژ منتقل گردیده و به آرامی تکان داده شد تا خوب مخلوط شود. لازم به ذکر است که این لوله ها به مدت پانزده دقیقه قبل از آزمایش درون یخچال نگهداری گردید. بعد از طی شدن این مدت زمان، ۵۰ میکرو لیتر از مخلوط را برداشته و به روی اسلاید قرار داده شد. اسلاید ها را به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه در دستگاه light-proof humidity chamber قرار داده شد. لازم به ذکر است که چون تمامی مراحل باید در درجه حرارت پایین و خنک صورت گیرد، درون دستگاه آب و یخ قرار داده شد. سپس ۴۰ میکرو لیتر از محلول کار NR به اسلاید ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه جهت نفوذ NR مجدداً درون دستگاه light-proof humidity chamber قرار داده شد. در مرحله بعد به آرامی بر روی اسلاید ها لامل را قرار داده و اسلاید ها هر ۱۵ دقیقه یکبار در زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید. نور میکروسکوپ در کمترین حد ممکن بود و همچنین نور برای تمامی اسلاید ها یکسان بود. در بررسی

^{۳۳} Dimethyl sulfoxide(DMSO)

اسلاید ها در زیر میکروسکوپ علائمی نظیر ترشح لیزوزوم به درون سیتوزول، هرگونه تغییر در سایز و رنگ لیزوزوم و شکل سلول مد نظر قرار گرفت. جدولی شبیه جدول زیر تهیه و در آن در زمان های مختلف علامت مثبت یا منفی ذکر گردید (جدول ۲-۷-۴). درون جدول زمانی که ۵۰٪ سلول ها یا بیشتر حالت عادی و همچنین سیتوزول شفاف و هیچ گونه تغییری در لیزوزوم مشاهده نگردید علامت مثبت گذاشته شد. زمانی که ۵۰٪ سلول ها یا بیشتر علائمی مبنی بر از دست دادن رنگ یا آنرمال شدن در لیزوزوم مشاهده شد علامت منفی قرار داده شد. آخرین زمانی که علامت مثبت قرار گرفت زمان Retention Time در نظر گرفته شد. زمان نهایی آزمایش ۱۸۰ دقیقه در نظر گرفته شد، به دلیل اینکه در اکثر موجودات محلول NR در زمان بیشتر این خود به عنوان عامل سمی و استرس زا برای سلول تبدیل می گردند.

جدول ۳-۷-۴ نمونه جدول استفاده شده در آزمایش NRR time

Blood No	۱۵ min	۳۰ min	۴۵ min	۶۰ min	۷۵ min	۹۰ min	۱۰۵ min	۱۲۰ min	۱۳۵ min	۱۵۰ min	۱۶۵ min	۱۸۰ min	Retention time
۱													
۲													
۳													
۴													
۵													
۶													
۷													
۸													
۹													
۱۰													

۳-۸ آنالیز میزان پایداری غشاء گلبول قرمز توسط روش EOF

یکی از روش های کم هزینه ولی با کارایی بالا در کسب اطلاعات پیرامون ساختار و ترکیبات غشاء و تاثیر عوامل آلاینده بر آن تست میزان پایداری غشاء گلبول قرمز یا EOF test^{۳۴} است. در این تست میزان همولیز سلول های گلبول قرمز در حضور یک شیب غلظتی از نمک مورد بررسی قرار می گیرد. در این بررسی، سنجش میزان تغییرات در پایداری غشاء گلبول قرمز با استفاده از این تست در نمونه های خون ماهی گل خورک از روش توصیه شده توسط Aldrich and Saunders در سال ۲۰۰۰ استفاده گردید.

قبل از خونگیری از ماهی محلول های مورد نیاز جهت انجام آزمایش به شرح زیر تهیه گردید. محلول استک ۱۰٪ شامل ۹۰ g NaCl، ۱۳/۶۵ g Na_2HPO_4 ، ۲/۳۴ g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ در یک لیتر آب دو بار تقطیر تهیه گردید. سپس برای تهیه استک ۱٪، ۱۰۰ میلی لیتر از محلول استک ۱۰٪ با ۹۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر مخلوط گردید. در ۱۶ میکروتیوب ۱۰۰ میلی لیتری غلظت های مورد نظر در آزمایش طبق جدول زیر تهیه گردید (جدول ۳-۸-۵). ۰/۲ میلی لیتر (۲۰۰ میکرو لیتر) از محلول های نمک فوق (محلول استک ۱٪) به هر یک از پانزده میکروتیوب اضافه و درون میکروتیوب شانزدهم همین مقدار آب دو بار تقطیر اضافه گردید. مقدار ۲ میکرو لیتر از نمونه خون هپارینه که خوب مخلوط و میکس شده به هر میکروتیوب اضافه و تا مقداری که کف نکند به هم زده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (Model Biofuge stratus, heraeus, Germany) گردید. پس از سانتریفیوژ، ماده شناور رویی را که حاوی هموگلوبین سلول های لیز شده است را برداشته و در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Model Specord 210, Germany) قرائت گردید. ماده شناور درون میکروتیوب شماره پانزده (محلول ۱/۵ g/l) به عنوان بلانک استفاده گردید چرا که این غلظت نزدیک اسمولاریته پلاسما اکثر موجودات است. میزان ۱۰۰٪ همولیز به میکروتیوب شانزدهم (حاوی آب مقطر) اختصاص دارد. لازم به ذکر است که نسبت خون به محلول نمک باید ۱ به ۱۰۰ باشد.

^{۳۴} Erythrocyte Osmotic Fragility test

جدول ۳-۸-۵ تهیه غلظت های مورد نظر جهت انجام آزمایش EOF

شماره لوله	غلظت	نحوه تهیه
۱	۲g\l(ppt)	آب مقطر 80 ml + استک ۱٪ ۲۰ml
۲	۳g\l(ppt)	آب مقطر 70 ml + استک ۱٪ ۳۰ml
۳	۳/۲۵g\l(ppt)	آب مقطر 67/5 ml + استک ۱٪ ۳۲/۵ml
۴	۳/۵g\l(ppt)	آب مقطر 65 ml + استک ۱٪ ۳۵ml
۵	۳/۷۵g\l(ppt)	آب مقطر 62/5 ml + استک ۱٪ ۳۷/۵ml
۶	۴g\l(ppt)	آب مقطر 60 ml + استک ۱٪ ۴۰ml
۷	۴/۲۵g\l(ppt)	آب مقطر 57/5 ml + استک ۱٪ ۴۲/۵ml
۸	۴/۵g\l(ppt)	آب مقطر 55 ml + استک ۱٪ ۴۵ml
۹	۴/۷۵g\l(ppt)	آب مقطر 42/5 ml + استک ۱٪ ۴۷/۵ml
۱۰	۵g\l(ppt)	آب مقطر 50 ml + استک ۱٪ ۵۰ml
۱۱	۵/۵g\l(ppt)	آب مقطر 45 ml + استک ۱٪ ۵۵ml
۱۲	۶g\l(ppt)	آب مقطر 40 ml + استک ۱٪ ۶۰ml
۱۳	۶/۵g\l(ppt)	آب مقطر 35 ml + استک ۱٪ ۶۵ml
۱۴	۷/۵g\l(ppt)	آب مقطر 25 ml + استک ۱٪ ۷۵ml
۱۵	۸/۵g\l(ppt)	آب مقطر 15 ml + استک ۱٪ ۸۵ml
۱۶	۰g\l(ppt)	آب مقطر

۳-۹ قرار گیری گلبول قرمز در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در شرایط آزمایشگاهی

در این مرحله از مطالعه میزان پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض غلظت های مختلف ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و در زمان های مختلف (۴ و ۲۴ ساعته) در شرایط آزمایشگاهی آنالیز می گردد. برای نیل به این مقصود، گلبول قرمز از ماهیان صید شده از ایستگاه بحرکان که کمترین میزان آلودگی در آن وجود دارد (جهت کاهش اثرات آلودگی قبلی بر گلبول قرمز) مورد استفاده قرار گرفت. سنجش میزان تغییرات در پایداری غشاء گلبول قرمز در نمونه های خون ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های - آروماتیک چند حلقه ای از روش توصیه شده توسط Gagnaire در سال ۲۰۰۶، Barakat در سال ۲۰۰۵ و Bado-Nilles و همکاران در سال ۲۰۰۸ با اندکی تغییرات استفاده گردید. به طور کلی مراحل این آزمایش به پنج مرحله: تهیه محلول های مورد نیاز آزمایش، تهیه غلظت های ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای، جداسازی گلبول قرمز از خون ماهی، قرار گیری گلبول قرمز در معرض ترکیبات آلاینده و سنجش تغییرات در پایداری غشاء گلبول قرمز به روش EOF تقسیم گردید.

۳-۹-۱ محلول های مورد نیاز آزمایش

محلول های مورد نیاز آزمایش شامل محلول $\text{Hepes } 25 \text{ mM}$ ، $\text{NaCl } 150 \text{ mM}$ در pH ۷/۴، و محلول فسفات بافر ($\text{NaCl } (8.8 \text{ g/l}) + \text{NaPO}_4\text{H}_2 \text{ } 77 \text{ ml} + \text{Na}_2\text{PO}_4\text{H} \text{ } 170 \text{ ml}$ در pH ۷/۴) تهیه گردید.

۳-۹-۲ تهیه غلظت های آلاینده

جهت تهیه غلظت های مختلف ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای شانزده ترکیب مختلف این آلاینده با محلول cyclohexane مخلوط گردید. تمامی غلظت ها به صورت روزانه تهیه گردید. غلظت های مورد استفاده در این آزمایش بر اساس غلظت های سنجش شده در نمونه آب محیط و

غلظت های حاد (Acute Potency Divisor) و مزمن (Chronic Potency Divisor) توصیه شده توسط سازمان محیط زیست آمریکا استفاده گردید (U.S. EPA, 1993) (جدول ۳-۹-۲-۶).

جدول ۳-۹-۲-۶ غلظت های مختلف ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مورد استفاده

16 PAHs	غلظت های محیطی (µg/L)	Acute Potency Divisor (µg/L)	Chronic Potency Divisor (µg/L)
N	nd	۸۰۳	۱۹۳
AC	۱/۵	۱۲۸۰	۳۰۷
ACE	nd	۲۳۲	۵۵/۸
F	۰/۵	۱۶۴	۳۹/۳
Ph	۲/۷	۷۹/۷	۱۹/۱
A	nd	۸۶/۱	۲۰/۷
Fl	۱/۸	۲۹/۶	۷/۱۱
Py	۰/۲	۴۲	۱۰/۱
B(a)A	۰/۴	۹/۲۸	۲/۲۳
Ch	۰/۸	۴۹/۸	۲/۰۴
B(b)Fl	nd	۲/۸۲	۰/۶۷۷
B(k)Fl	nd	۲/۶۷	۰/۶۴۲
B(a)Py	۰/۸	۳/۹۸	۰/۹۵۷
IPy	nd	۱/۱۴	۰/۲۷۵
DB(ah)A	nd	۱/۱۷	۰/۲۸۲
B(ghi)Pe	nd	۱/۸۳	۰/۴۳۹

۳-۹-۳ جداسازی گلبول قرمز

خونگیری با سرنگ هپارینه انجام و سپس با محلول $\text{Hepes } 25\text{mM}$, $\text{NaCl } 150\text{ mM}$ در $\text{pH } 7.4$ شستشو و به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد در 3000 rpm سه مرتبه سانتریفیوژ گردید. نمونه های خون در هر سه مرتبه توسط محلول سرد فوق شستشو و در هرمرتبه سانتریفیوژ ماده شناور بالایی به دقت برداشته شد.

۳-۹-۴ قرار گیری گلبول قرمز در معرض ترکیبات مختلف آلاینده

در این مرحله غلظت های مورد نظر آلاینده (جدول ۲-۹-۶) را به مخلوط فسفات بافر و گلبول قرمز افزوده گردید. لازم به ذکر است که نسبت سیکلو هگزان به گلبول قرمز از ۵/۰٪ (۷:۷) نباید تجاوز کند. دو نمونه شاهد شامل: مخلوط گلبول قرمز در فسفات بافر، مخلوط گلبول قرمز در سیکلو هگزان نیز تهیه گردید. نمونه های آزمایش در دوره های زمانی ۴ و ۲۴ ساعته در درجه حرارت اتاق قرار داده شد.

۳-۹-۵ سنجش تغییرات پایداری غشاء گلبول قرمز

تغییرات غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض غلظت های فوق الذکر و در مدت زمان های مختلف توسط روش EOF آنالیز گردید.

۳-۱۰ روش های آماری و نرم افزار های مورد استفاده:

تجزیه و تحلیل آماری داده با نرم افزار SPSS (Version19) انجام پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل داده های حاصل از انجام آزمایش ابتدا نرمال بودن داده ها توسط آزمون کولموگراف-اسمیرنف بررسی شد. از ANOVA یک طرفه جهت تعیین وجود و یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین داده ها استفاده شد. جهت تعیین دقیق وجود یا عدم وجود تفاوت معنی دار از پس آزمون Tukey استفاده شد. اختلاف بین میانگین داده در سطح معنای ۰.۰۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین وجود ارتباط خطی و میزان آن بین مقادیر تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و نشانگر های زیستی در بافت های ماهی از آزمون رگرسیون خطی و همبستگی پیرسون استفاده شد و معادله رگرسیونی آن به دست آمد.

فصل چهارم: تجزیه و تحلیل داده ها

۴ نتایج:

ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* جمع آوری شده در ایستگاه های مختلف نمونه برداری با سطوح آلودگی مختلف، الگو های متفاوتی از تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و همچنین پاسخ های فیزیولوژیک به عنوان مکانیسم تاثیر پذیری و یا سمیت زدایی را نشان می دهد. در این مطالعه از بین ترکیبات شناخته شده هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای، شانزده ترکیب آنالیز گردید (جدول ۴-۷).

جدول ۴-۷ ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای سنجش شده

ردیف	نام فارسی	نام انگلیسی	نماد
۱	نفتالن	Naphthalene	N
۲	اس نفتالن	Acenaphthylene	AC
۳	اس نفتن	Acenaphthene	ACE
۴	فلورن	Fluorene	F
۵	فنانترن	Phenanthrene	Ph
۶	آنتراسن	Anthracene	A
۷	فلورانتن	Fluoranthene	Fl
۸	پایرن	Pyrene	Py
۹	بنزو (آ) آنتراسن	Benz(a)anthracene	B(a)A
۱۰	کرایسن	Chrysene	Ch
۱۱	بنزو (ب) فلورانتن	Benzo(b)fluoranthene	B(b)Fl
۱۲	ایندینو (۱،۲،۳ سی دی) پایرن	Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	IPy
۱۳	بنزو (ک) فلورانتن	Benzo(k)fluoranthene	B(k)Fl
۱۴	بنزو (آ) پایرن	Benzo(a)pyrene	B(a)Py
۱۵	دی بنزو (آ،اچ) آنتراسن	Dibenz(a,h)anthracene	DB(ah)A
۱۶	بنزو (جی اچ آی) پرین	Benzo(ghi) perylene	B(ghi)Pe

۴-۱ میزان تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد

میانگین طول و وزن ماهیان گل خورک صید شده به ترتیب $17 \pm 0.1 \text{ cm}$ و $16 \pm 0.2 \text{ g}$ بود. جدول ۴-۱-۸ مقادیر ثبت شده از میزان تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد ماهی در ایستگاه های مختلف نمونه برداری نشان داده شده است. از بین شانزده ترکیب هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای فقط نه ترکیب (AC, F, Ph, Fl, Py, B(a)A, Ch, B(b)Fl, B(a)Py) در بافت کبد ماهی گل خورک در ایستگاه های مختلف نمونه برداری یافت گردید (جدول ۴-۱-۸). از میان ترکیبات مذکور در بافت کبد ماهی ترکیب Py بیشترین میزان را در ایستگاه های اروند، زنگی، سمایلی و بحرکان نشان می دهد، اما در ایستگاه جعفری ترکیب B(a)A غلظت بالایی را نسبت به سایر ترکیبات نشان می دهد. در نتایج مربوط به مجموع ۱۶ تایی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$)، ایستگاه جعفری بیشترین میزان را نشان می دهد که ایستگاه های زنگی < اروند < سمایلی < و بحرکان در رتبه های بعدی قرار دارند. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه، ANOVA نشان می دهد که میزان تجمع زیستی مجموع ۱۶ تایی این ترکیبات ($\Sigma 16\text{PAH}$) در بافت کبد ماهی گل خورک، بین ایستگاه های جعفری و بحرکان اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$)، اما بین ایستگاه های دیگر اختلاف معنی داری یافت نگردید ($p > 0.05$).

۴-۲ میزان تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت آبشش

میزان تجمع زیستی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای سنجش شده در نمونه های بافت آبشش در ایستگاه های مختلف نمونه برداری در جدول ۴-۱-۸ نشان داده شده است. همان طور که در جدول ۴-۱-۸ نشان داده شده است از بین شانزده ترکیب آنالیز شده تنها پنج ترکیب AC, F, Ph, Fl, Py در بافت آبشش ماهی در ایستگاه های مختلف یافت شد، این در حالی است که در ایستگاه بحرکان فقط سه ترکیب Py, Fl, Ph یافت شد. نتایج مربوط به مجموع ۱۶ تایی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$)، ایستگاه جعفری بیشترین میزان را نشان می دهد که ایستگاه های زنگی < سمایلی < اروند < و بحرکان در رتبه های بعدی قرار دارند. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه، ANOVA نشان می دهد که میزان تجمع زیستی مجموع ۱۶ تایی این ترکیبات ($\Sigma 16\text{PAH}$) در بافت آبشش ماهی گل خورک، بین ایستگاه جعفری و بحرکان با یکدیگر و همچنین بین این دو ایستگاه با دیگر ایستگاه های نمونه برداری اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$). میزان تجمع زیستی این ترکیبات در بافت آبشش در مقایسه با بافت کبد به جز در ایستگاه بحرکان اختلاف معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.05$).

جدول ۴-۱-۸ مقادیر سنجش شده (میانگین \pm انحراف معیار) ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد ($\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) و آبشش ($\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) ماهی گل خورک

PAHs	بافت	اروند	PAHs %	جعفری	PAHs %	زنگی	PAHs %	سمایی	PAHs %	بحرکان	PAHs %
N	L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AC	L	$3/532 \pm 0/49^a$	11/91	$4/381 \pm 0/54^a$	9/40	$1/829 \pm 0/177^b$	5/68	$2/233 \pm 0/55^b$	9/54	nd	nd
	G	$1/956 \pm 0/58^{bc}$	25/10	$1/934 \pm 0/694^{bc}$	10/89	$1/432 \pm 0/382^c$	17/68	$3/09 \pm 0/984^d$	37/48	nd	nd
ACE	L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F	L	$2/471 \pm 0/55^a$	8/32	$1/051 \pm 0/132^b$	2/25	$0/558 \pm 0/083^b$	1/73	$0/660 \pm 0/095^c$	2/83	nd	nd
	G	$2/137 \pm 0/57^a$	27/42	$0/993 \pm 0/187^b$	5/60	$0/980 \pm 0/191^{cb}$	12/11	$1/450 \pm 0/344^{ab}$	18/06	$1/963 \pm 0/621^a$	$63/11$
Ph	L	$3/576 \pm 0/676^a$	12/05	$9/265 \pm 0/826^b$	19/87	$2/619 \pm 0/449^a$	8/13	$3/073 \pm 0/625^a$	13/14	$1/053 \pm 0/330^e$	$26/50$
	G	$1/218 \pm 0/287^{ce}$	15/63	$11/388 \pm 1/630^b$	64/12	$1/761 \pm 0/501^c$	21/74	$1/342 \pm 0/430^{ce}$	16/71	$0/177 \pm 0/048^e$	$5/70$
A	L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fl	L	$1/019 \pm 0/435^a$	3/40	$3/222 \pm 0/763^b$	6/91	$1/036 \pm 0/431^a$	3/21	$4/119 \pm 0/337^{db}$	17/62	nd	nd
	G	$1/623 \pm 0/316^a$	20/82	$3/118 \pm 0/402^b$	17/55	$3/190 \pm 0/847^b$	39/38	$1/562 \pm 0/388^a$	19/46	nd	nd
Py	L	$5/634 \pm 0/830^a$	19/00	$2/168 \pm 0/468^b$	4/65	$9/586 \pm 1/030^c$	29/75	$13/296 \pm 0/976^b$	56/87	$2/932 \pm 0/792^b$	$73/50$
	G	$0/860 \pm 0/140^a$	11/03	$0/326 \pm 0/040^b$	1/84	$0/736 \pm 0/180^a$	9/09	$0/665 \pm 0/090^a$	8/29	$0/973 \pm 0/126^a$	$31/28$
B(a)A	L	$5/275 \pm 1/110^a$	17/78	$14/460 \pm 2/931^b$	31/00	$7/152 \pm 1/451^c$	22/20	nd	nd	nd	nd
	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ch	L	$4/110 \pm 0/627^a$	13/86	$9/828 \pm 1/270^b$	21/07	$4/097 \pm 0/897^a$	12/72	nd	nd	nd	nd
	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B(b)Fl	L	$0/750 \pm 0/183^a$	2/53	nd	nd	$3/036 \pm 0/847^b$	9/43	nd	nd	nd	nd
	G	nd	nd	nd	nd	nd	n	nd	nd	nd	nd
B(k)Fl	L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B(a)Py	L	$3/307 \pm 0/827^a$	11/15	$2/263 \pm 0/687^b$	4/85	$2/303 \pm 0/524^b$	7/18	nd	nd	nd	nd
	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IPy	L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DB(ah)	L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B(ghi)P	L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
e	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ PAH	L	$29/67 \pm 1/678^a$		$46/64 \pm 4/782^b$		$32/22 \pm 2/971^a$		$23/38 \pm 4/981^a$		$3/99 \pm 1/328^d$	
	G	$7/79 \pm 0/524^a$		$17/76 \pm 4/504^b$		$8/10 \pm 0/963^a$		$8/03 \pm 0/858^a$		$3/11 \pm 0/894^c$	

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در هر ردیف است ($p > 0.05$); G: آبشش; L: کبد; nd: non detected ($\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$)

۳-۴ میزان غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب

در جدول ۳-۴-۹ مقادیر مربوط به غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب ایستگاه های مختلف نمونه برداری نشان داده شده است. از میان ترکیبات آنالیز شده در رسوبات ترکیبات : N ,A ,ACE ,IPy ,DB(ah)A ,B(ghi)Pe B(b)Fl, B(k)Fl, B(a)Py نیز در ایستگاه های سمایی و بحرکان یافت نگردید. در میان ۱۶ ترکیب سنجش شده غلظت ترکیب B(a)A بیشترین میزان را در بین نمونه های رسوب ایستگاه های مختلف نشان می دهد. در نتایج مربوط به مجموع ۱۶ تایی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$)، ایستگاه جعفری بیشترین میزان را نشان می دهد که ایستگاه های زنگی < ارونند < سمایی و بحرکان از این حیث در رتبه های بعدی قرار دارند. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه، ANOVA نشان می دهد از لحاظ میزان مجموع ۱۶ تایی این ترکیبات ($\Sigma 16\text{PAH}$) در نمونه های رسوب، بین ایستگاه های مختلف نمونه برداری (ارونند، جعفری، زنگی، سمایی، بحرکان) اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$).

۴-۴ میزان غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های آب

میزان غلظت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای آنالیز شده در نمونه های آب ایستگاه های مختلف نمونه برداری در جدول ۳-۴-۹ نشان داده شده است. از میان ترکیبات آنالیز شده در آب ترکیبات : Py, Ph ,Ch ,Fl ,F ,AC ,B(a)A ,B(a)Py در ایستگاه های مختلف نمونه برداری یافت گردید. در نتایج مربوط به مجموع ۱۶ تایی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) در نمونه های آب، ایستگاه جعفری بیشترین میزان را نشان می دهد که ایستگاه های زنگی < سمایی و بحرکان در رتبه های بعدی قرار دارند. از لحاظ غلظت مجموع ۱۶ تایی این ترکیبات در نمونه های آب، بین ایستگاه های جعفری و بحرکان با یکدیگر و نیز با دیگر ایستگاه ها اختلاف معنی داری یافت شد ($p < 0.05$)، اما بین ایستگاه های دیگر نمونه برداری (ارونند، زنگی و سمایی) اختلاف معنی داری یافت نگردید ($p > 0.05$).

جدول ۴-۳-۹ مقادیر سنجش شده (میانگین \pm انحراف معیار) ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوبات ($\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) و آب ($\mu\text{g/l}$)

PAHs	نوع بافت	اروند	PAHs %	جعفری	PAHs %	زنگی	PAHs %	سمایلی	PAHs %	بحرکان	PAHs %
N	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	W	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AC	S	$13/297 \pm 1/451^a$	۰/۹۱	$132/112 \pm 9/9.0^b$	۳/۹	$74/9.03 \pm 6/0.15^c$	۳/۹۲	$1/979 \pm 0/461^d$	۰/۵۴	nd	nd
	W	$1/584 \pm 0/331^a$	۳۰/۲۸	$1/121 \pm 0/155^a$	۶/۱۱	$0/810 \pm 0/110^a$	۱۳/۲۷	$2/634 \pm 0/522^b$	۴۳/۴۶	nd	nd
ACE	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	W	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F	S	$44/0.5 \pm 1/59.0^a$	۳/۰۴	$17/353 \pm 1/48.0^b$	۰/۵۱	$3/322 \pm 0/792^c$	۰/۱۷	$4/319 \pm 0/69.0^c$	۱/۱۹	$4/698 \pm 0/69.0^c$	۴/۱۳
	W	$1/123 \pm 0/223^a$	۲۱/۴۷	$0/566 \pm 0/26^b$	۳/۰۸	$0/286 \pm 0/0.65^c$	۴/۷۳	$0/341 \pm 0/0.31^c$	۵/۶۲	$0/300 \pm 0/0.26^c$	۳۷/۵
Ph	S	$20/989 \pm 2/769^a$	۱/۴۵	$632/682 \pm 27/72^b$	۱۸/۶۹	$33/429 \pm 2/69.0^a$	۱/۷۵	$36/861 \pm 3/0.3^a$	۱۰/۲۱	$15/438 \pm 1/64^a$	۱۳/۶۰
	W	$0/40.6 \pm 0/28^a$	۷/۷۶	$11/104 \pm 1/391^b$	۶۰/۵۴	$0/449 \pm 0.51^a$	۷/۴۳	$0/455 \pm 0/0.4^a$	۷/۵۰	$0/373 \pm 0/0.14^a$	۴۶/۶۲
A	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	W	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fl	S	$5/164 \pm 0/237^a$	۰/۳۵	$178/975 \pm 9/38^b$	۵/۲۸	$29/546 \pm 3/0.1^c$	۱/۵۴	$17/445 \pm 2/432^d$	۴/۸۳	$14/289 \pm 1/74^d$	۱۲/۵۸
	W	$0/734 \pm 0/0.91^a$	۱۴/۰۳	$2/818 \pm 0/632^b$	۱۵/۳۶	$2/162 \pm 0/467^{bc}$	۳۵/۷۹	$1/472 \pm 0/371^{ac}$	۲۴/۲۹	nd	nd
Py	S	$114/260 \pm 4/645^a$	۷/۹	$126/0.51 \pm 7/979^a$	۳/۷۲	$426/0.15 \pm 14/55^b$	۲۲/۳۳	$71/298 \pm 6/0.77^c$	۱۹/۷۵	$28/476 \pm 3/46^d$	۲۵/۰۸
	W	$0/167 \pm 0/0.80^{de}$	۳/۱۹	$0/174 \pm 0/0.15^{de}$	۰/۹۴	$0/348 \pm 0/0.54^c$	۵/۷۶	$0/208 \pm 0/0.23^d$	۳/۴۳	$0/125 \pm 0/0.40^e$	۱۵/۶۲
B(a)A	S	$623/201 \pm 18/16^a$	۴۳/۰۸	$1132/562 \pm 59/923^b$	۳۳/۴۶	$649/151 \pm 20/0.6^a$	۳۴/۰۲	$188/622 \pm 8/388^{cd}$	۵۲/۲۷	$33/220 \pm 3/379^d$	۲۹/۰۶
	W	$0/453 \pm 0/0.15^a$	۸/۶۶	$0/565 \pm 0/0.83^a$	۳/۰۸	$0/460 \pm 0/0.64^a$	۷/۶۱	$0/308 \pm 0/0.72^b$	۵/۰۸	nd	nd
Ch	S	$330/579 \pm 16/0.5^a$	۲۲/۸۵	$76/70.6 \pm 7/28^b$	۲۲/۴۷	$307/695 \pm 14/0.9^a$	۱۶/۱۲	$40/299 \pm 3/245^{cd}$	۱۱/۱۶	$17/379 \pm 1/491^d$	۱۵/۳۱
	W	nd	nd	$1/150 \pm 0/19.0^a$	۶/۲۷	$0/791 \pm 0/0.89^a$	۱۳/۰۹	$0/645 \pm 0/121^a$	۱۰/۶۴	nd	nd
B(b)Fl	S	$26/360 \pm 3/20.3^a$	۱/۸	$59/813 \pm 4/12.0^b$	۱/۷۶	$111/277 \pm 7/90.1^c$	۵/۸۳	nd	nd	nd	nd
	W	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B(k)Fl	S	$27/968 \pm 3/721^a$	۱/۹	$41/532 \pm 4/198^b$	۱/۲۲	$72/833 \pm 4/854^c$	۳/۸۱	nd	nd	nd	nd
	W	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B(a)Py	S	$240/500 \pm 12/494^a$	۱۶/۶۳	$302/557 \pm 14/891^b$	۸/۹۳	$199/636 \pm 7/20.6^c$	۱۰/۴۶	nd	nd	nd	nd
	W	$0/763 \pm 0/0.25^a$	۱۴/۵۸	$0/839 \pm 0/0.33^a$	۴/۵۷	$0/741 \pm 0/10.9^a$	۱۲/۲۶	nd	nd	nd	nd
IPy	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	W	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DB(ah)	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A	W	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B(ghi)P	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
e	W	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ PAH	S	$1446/323 \pm 200/950^a$		$3384/34 \pm 376/946^b$		$1907/81 \pm 210/486^c$		$360/82 \pm 65/0.28^d$		$113/50 \pm 10/334^e$	
	W	$5/23 \pm 0/479^a$		$18/34 \pm 3/648^b$		$6/12 \pm 0/60.3^a$		$6/0.6 \pm 0/887^a$		$0/80 \pm 0/127^d$	

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در هر ردیف است ($p > 0.05$); S: رسوب; W: آب; nd: non detected; (رسوب: $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$ -۱/۵-۰/۵; آب: $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$ -۱/۲-۰/۱) (nd < ۰/۱)

۴-۵ الگوی پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

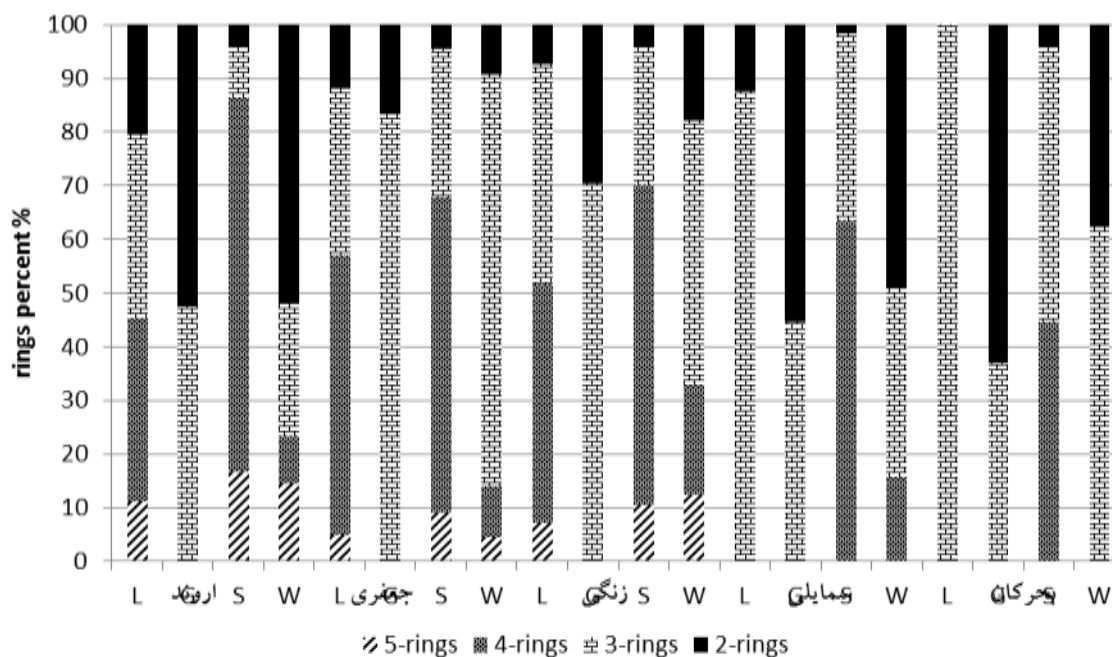
هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای آنالیز شده بر اساس تعداد حلقه های بنزنی به چهار گروه ترکیبات دو و سه و چهار و پنج حلقه ای تقسیم بندی می شوند. از این رو و بر اساس تعداد حلقه های بنزنی، الگوی پراکنش این ترکیبات در نمونه های زیستی (کبد و آبشش) و غیر زیستی (رسوب و آب) آنالیز شده، مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی الگوی پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد نشان دهنده غالبیت ترکیبات سه حلقه ای در بافت کبد ماهی گل خورک صید شده از ایستگاه های سمایلی و بحرکان است، در حالی که در ایستگاه جعفری ترکیبات چهار حلقه ای غالبیت دارند. با این حال در ایستگاه اروند ترکیبات سه و چهار حلقه ای میزان تقریباً یکسانی دارند و نسبت به سایر ترکیبات دارای غالبیت هستند (نمودار ۴-۵-۱).

در بافت آبشش ماهی گل خورک صید شده ترکیبات دو حلقه ای هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاه های اروند، سمایلی و بحرکان غالب بودند. اما در بافت آبشش ماهیان مربوط به ایستگاه های جعفری و زنگی ترکیبات سه حلقه ای دارای غالبیت بودند (نمودار ۴-۵-۱).

بررسی الگوی پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوبات بیانگر غالبیت ترکیبات چهار حلقه ای در ایستگاه های مختلف (اروند، جعفری، زنگی و سمایلی) به جز ایستگاه بحرکان است. در نمونه های رسوب ایستگاه بحرکان ترکیبات سه حلقه ای غالب بود، با این حال ترکیبات چهار حلقه ای در این ایستگاه نیز در رتبه دوم غالبیت قرار دارند (نمودار ۴-۵-۱).

در نمونه های آب مربوط به ایستگاه های مختلف ترکیبات دو حلقه ای در ایستگاه های اروند و سمایلی دارای غالبیت بودند اما در سایر ایستگاه ها (جعفری، زنگی و بحرکان) ترکیبات سه حلقه ای غالب بود، با این حال در این ایستگاه ها نیز ترکیبات دو حلقه ای در رتبه دوم از لحاظ غالبیت قرار دارند (نمودار ۴-۵-۱).



نمودار ۳-۵-۱۰. الگوی پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های زیستی و غیر زیستی

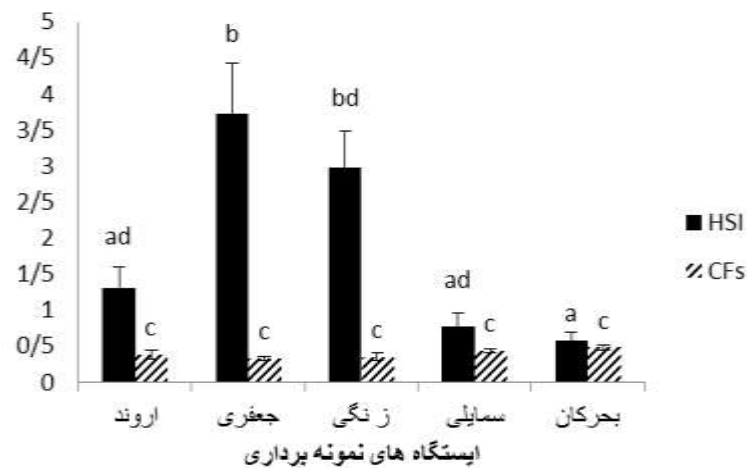
(S: رسوب؛ L: کبد؛ G: آبشش؛ W: آب)

۶-۴ تعیین منبع آلودگی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

از نسبت های فلورانتن/پایرن، کرایسن/بنزو ای آنتراسن جهت تعیین منبع آلاینده هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در منطقه نمونه برداری استفاده گردید (Zuloaga et al., 2009). نتایج مربوط به نسبت فلورانتن/پایرن در نمونه های رسوب و بافت کبد ماهی گل خورک در ایستگاه های مختلف نمونه برداری به جز در ایستگاه جعفری عدد کمتر از یک را نشان می دهد. همچنین نتایج مربوط به نسبت کرایسن/بنزو ای آنتراسن در نمونه های رسوب و بافت کبد ماهی گل خورک عدد بیشتر از یک را در ایستگاه های جعفری و اروند و زنگی نشان می دهد، اما در ایستگاه های دیگر به دلیل عدم یافتن ترکیبات مد نظر امکان برقراری نسبت کرایسن/بنزو ای آنتراسن میسر نبود. نتایج مربوط به نمونه های آب و بافت آبشش ماهی گل خورک مربوط به نسبت فلورانتن/پایرن عدد بیشتر از یک را به جز در ایستگاه بحرکان نشان می دهد. نسبت کرایسن/بنزو ای آنتراسن در نمونه های آب در ایستگاه های اروند و جعفری عدد بالاتر از یک و در ایستگاه زنگی عدد کمتر از یک را نشان می دهد. اعداد کمتر از یک در نسبت های فوق الذکر (فلورانتن/پایرن، کرایسن/بنزو ای آنتراسن) بیانگر منشأ پتروژنیک و اعداد بیشتر از یک بیانگر منشأ پیرولیتیک است.

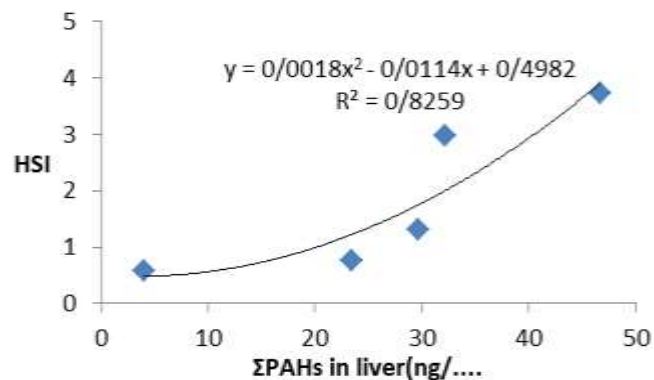
۷-۴ شاخص های بیولوژیک

میزان شاخص های HSI و CF در نمودار ۲-۷-۴ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده وجود رابطه معنی داری ($p < 0/01$ و $r = 0/534$) بین شاخص HSI و مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) در بافت کبد ماهی گل خورک است (نمودار ۳-۷-۴). نتایج همچنین نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین ایستگاه های مختلف نمونه برداری از لحاظ شاخص CF است ($p > 0/05$).



نمودار ۲-۷-۴ میزان $\text{HSI} \pm \text{std}$ و $\text{CF} \pm \text{std}$

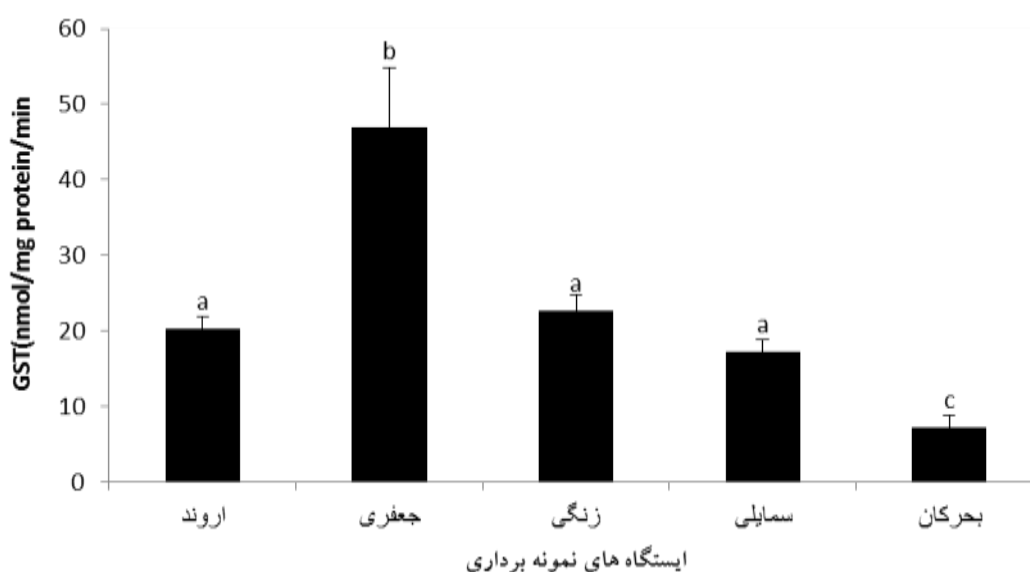
اعداد مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار هستند.



نمودار ۳-۷-۴ رابطه بین HSI و میزان $\Sigma 16\text{PAH}$

۸-۴ فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز

میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در بافت کبد ماهی گل خورک در نمودار ۴-۸-۴ نشان داده شده است. کمترین میزان فعالیت آنزیم در سایت بحرکان ($7/19 \pm 1/541$ nmol/mg protein/min) و بیشترین میزان آن در سایت جعفری ($46/96 \pm 7/877$ nmol/mg protein/min) یافت شد. نتایج نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار از نظر فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در بافت کبد ماهی گل خورک بین ایستگاه جعفری و بحرکان با یکدیگر و همچنین با دیگر ایستگاه های نمونه برداری است ($p < 0/05$)، اما بین سایر ایستگاه های نمونه برداری اختلاف معنی داری یافت نگردید ($p > 0/05$).

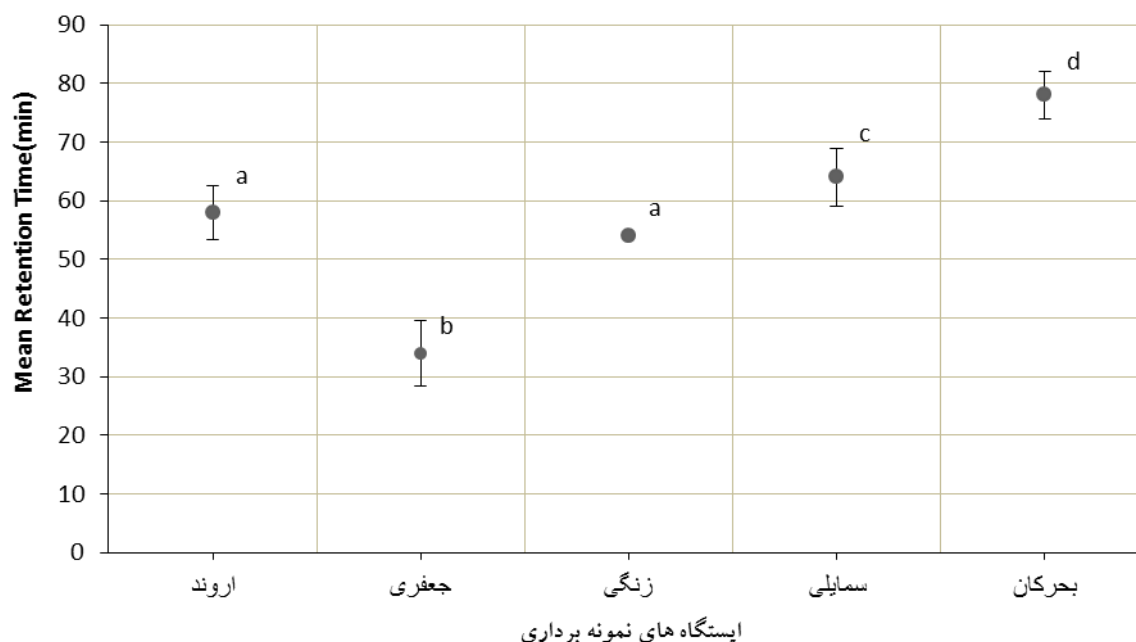


نمودار ۴-۸-۴ میانگین \pm انحراف معیار فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز

اعداد مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار هستند.

۹-۴ نتایج NRR time

نتایج مربوط به میانگین NRR time نمونه های خون ماهی گل خورک در ایستگاه های نمونه برداری در نمودار ۵-۹-۴ نشان داده شده است. میانگین RT مربوط به سی نمونه خون ماهی گل خورک به عنوان شاخص هر ایستگاه مد نظر قرار گرفت. میانگین RT نمونه های خون ماهی گل خورک در تمامی ایستگاه های نمونه برداری پایین تر از ۹۰ دقیقه بود. کمترین میزان میانگین RT نمونه های خون ماهی گل خورک در ایستگاه جعفری (۳۴ دقیقه) و بیشترین آن در ایستگاه بحرکان (۷۸ دقیقه) ثبت گردید. میانگین RT بین ایستگاه های نمونه برداری به جز ایستگاه اروند با زنگی، اختلاف معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.05$).



نمودار ۵-۹-۴ میانگین NRR time نمونه های خون ماهی گل خورک در ایستگاه های نمونه برداری

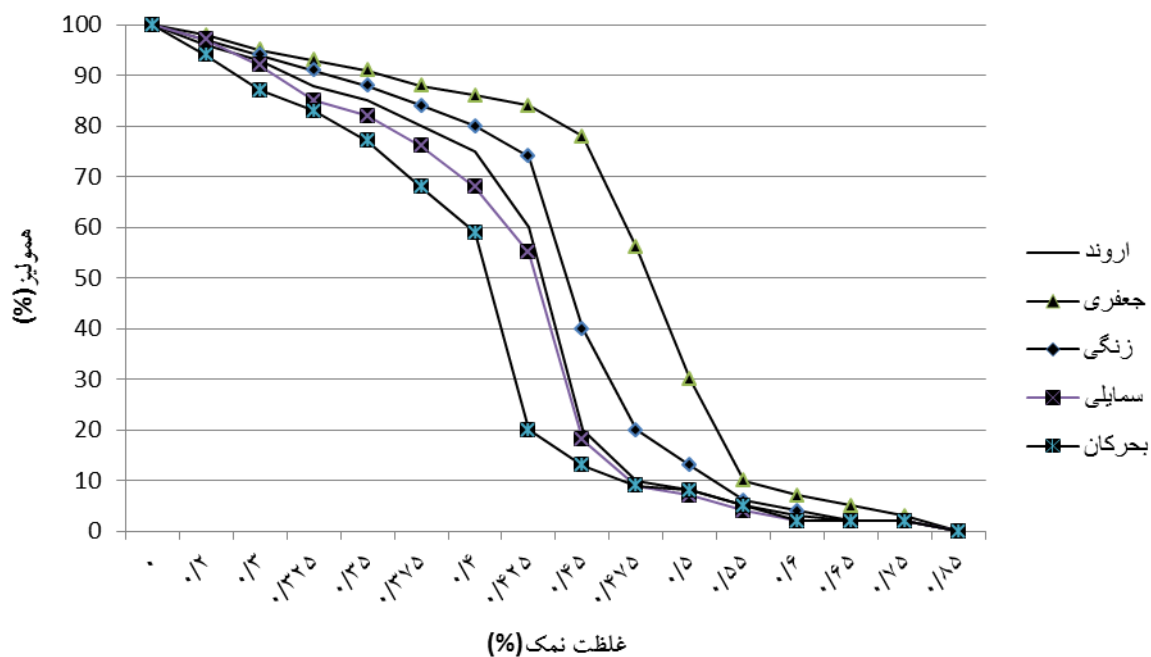
حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار هستند

۱۰-۴ نتایج تست EOF

نتایج میانگین درصد همولیز سلول های گلبول قرمز ماهی گل خورک صید شده از ایستگاه های مختلف نمونه بردای در جدول ۱۰-۴ نشان داده شده است. رسم منحنی میزان تغییرات در پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک نسبت به شیب غلظتی نمک (منحنی EOF) در ایستگاه های مختلف نمونه برداری نشان می دهد که غشاء گلبول قرمز ماهیان صید شده از ایستگاه جعفری در مقایسه با دیگر ایستگاه ها قوام و پایداری کمتری دارد (بسیار شکننده و ترد است) که ایستگاه های زنگی < ارونند < سمایلی < و بحرکان از این نظر در رتبه های بعدی قرار دارند (نمودار ۱۰-۴-۶). میانگین میزان تغییر در مقادیر ثبت شده از میزان جذب هموگلوبین سلول های لیز شده در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در جدول ۱۰-۴-۱۱ نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه، ANOVA نشان می دهد که میزان پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک در ایستگاه های مختلف نمونه برداری با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ($p < 0.05$).

جدول ۱۰-۴-۱۰ میانگین درصد همولیز سلول های گلبول قرمز ماهی گل خورک

%NaCl	در صد همولیز				
	ایستگاه های نمونه برداری				
	بحرکان	سمایلی	زنگی	جعفری	اروند
↓	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰	۹۴±۲/۲	۹۷±۲/۹	۹۷±۳/۰	۹۸±۳/۲	۹۶±۲/۸
۰/۲	۸۷±۲/۱	۹۲±۲/۲	۹۴±۲/۸	۹۵±۳/۰	۹۳±۲/۲
۰/۳	۸۳±۲/۰	۸۵±۲/۲	۹۱±۲/۵	۹۳±۲/۶	۸۸±۲/۰
۰/۳۲۵	۷۷±۱/۹	۸۲±۲/۱	۸۸±۲/۲	۹۱±۲/۵	۸۵±۱/۹
۰/۳۵	۶۸±۱/۸	۷۶±۱/۸	۸۴±۲/۰	۸۸±۲/۳	۸۰±۱/۷
۰/۳۷۵	۵۹±۱/۷	۶۸±۱/۷	۸۰±۲/۰	۸۶±۲/۲	۷۵±۱/۶
۰/۴	۲۰±۱/۱	۵۵±۱/۶	۷۴±۱/۹	۸۴±۲/۱	۶۰±۱/۶
۰/۴۲۵	۱۳±۱/۰	۱۸±۱/۰	۴۰±۱/۵	۷۸±۲/۱	۲۰±۱/۰
۰/۴۵	۹±۰/۸	۹±۰/۸	۲۰±۱/۱	۵۶±۲/۰	۱۰±۰/۹
۰/۴۷۵	۸±۰/۷	۷±۰/۶	۱۳±۱/۰	۳۰±۱/۸	۸±۰/۹
۰/۵	۵±۰/۵	۴±۰/۴	۶±۰/۷	۱۰±۱/۰	۵±۰/۶
۰/۵۵	۲±۰/۲	۲±۰/۳	۴±۰/۶	۷±۰/۸	۳±۰/۴
۰/۶	۲±۰/۱	۲±۰/۱	۲±۰/۲	۵±۰/۶	۲±۰/۳
۰/۶۵	۲±۰/۱	۲±۲/۱	۲±۲/۲	۳±۰/۲	۲±۰/۲
۰/۷۵
۰/۸۵



نمودار ۴-۱۰-۶ نمودار EOF ماهی گل خورک در ایستگاه های مختلف نمونه برداری

جدول ۴-۱۰-۱۱ میزان مقادیر (میانگین \pm انحراف معیار) جذب هموگلوبین سلول های لیز شده در طول موج ۳۴۰ نانومتر

در ایستگاه های مختلف نمونه برداری

ایستگاه نمونه برداری	EOF(n=۳۰)
اروند	0.439 ± 0.041^a
جعفری	0.542 ± 0.032^b
زنگی	0.462 ± 0.051^c
سمایی	0.420 ± 0.060^d
بحرکان	0.379 ± 0.042^e

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار است.

۴- ۱۱ رابطه بین تجمع هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و نشانگر های زیستی

نتایج مربوط به ضریب همبستگی پیرسون در مورد رابطه بین تجمع هیدروکربن های آروماتیک چند-حلقه ای و نشانگر های زیستی در جدول ۴-۱۱-۱۲ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده وجود رابطه معنی دار قوی بین انواع مختلف نشانگر های زیستی مورد استفاده در این بررسی (آنزیم گلوکوتایون اس-ترانسفراز، تغییرات غشاء لیزوزوم و میزان پایداری غشاء گلبول قرمز) است ($p < 0.01$). همچنین رابطه معنی دار قوی بین تجمع هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد ماهی و رسوبات با نشانگر های زیستی یافت گردید ($p < 0.01$).

جدول ۴-۱۱-۱۲ ضریب همبستگی پیرسون و رابطه بین تجمع هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و نشانگر های زیستی

	NRRt	EOF	GST	Liver PAHs	Sediment PAHs
NRRt	-	۰/۸۸۳ ($p < 0.01$)	۰/۶۹۲ ($p < 0.01$)	۰/۶۴۹ ($p < 0.01$)	۰/۶۴۹ ($p < 0.01$)
EOF	-	-	۰/۵۱۹ ($p < 0.01$)	۰/۶۹۷ ($p < 0.01$)	۰/۶۰۷ ($p < 0.01$)
GST	-	-	-	۰/۸۵۳ ($p < 0.01$)	۰/۷۵۳ ($p < 0.01$)
Liver PAHs	-	-	-	-	۰/۸۷۶ ($p < 0.01$)
Sediment PAHs	-	-	-	-	-

۴-۱۲ نتایج قرار گیری گلبول قرمز ماهی گل خورک در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

نتایج میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض شانزده ترکیب مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در غلظت ها (جدول ۳-۹-۲-۶) و زمان های مختلف (۴ و ۲۴ ساعته) در جدول ۴-۱۲-۱۳ نشان داده شده است. دو نمونه شاهد شامل مخلوط گلبول قرمز و بافر (شاهد ۱) و مخلوط گلبول قرمز و بافر و حلال سیکلو هگزان (شاهد ۲)، هر دو نمونه شاهد فاقد ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بودند، در نظر گرفته شد. میزان همولیز گلبول قرمز در نمونه های شاهد ۱ و ۲ در زمان های مختلف ۴ و ۲۴ ساعته مقادیر یکسانی را نشان دادند.

همان طور که در جدول ۴-۱۲-۱۳ نشان داده شده است میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک که در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با غلظت های نزدیک به محیط طبیعی قرار گرفته است، افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه های شاهد ۱ و ۲ نشان نمی دهد ($p > 0.05$). با این حال، میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض ترکیبات با غلظت حاد (Acute Potency Divisor) افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه های شاهد ۱ و ۲ نشان می دهد ($p < 0.05$). میزان همولیز با افزایش مدت زمان در معرض قرار گیری افزایش می یابد، اما افزایش معنی داری بین زمان های ۴ و ۲۴ ساعته مشخص نگردید ($p > 0.05$). انجام تست ANOVA دو طرفه (سطوح آلودگی و مدت زمان در معرض قرار گیری) نشان دهنده اثر مدت زمان در معرض قرار گیری و سطوح آلودگی بر میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک می باشد ($p < 0.05$).

میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض ترکیبات با غلظت مزمن (Chronic Divisor Potency) در مقایسه با دیگر غلظت ها واکنش متفاوتی را نشان می دهد به نحوی که پس از قرار گیری در معرض این غلظت ها میزان همولیز کاهش می یابد، در واقع این غلظت ها خاصیت آنتی همولیتیک را از خود نشان می دهند. با این وجود میزان این خاصیت با افزایش مدت زمان در معرض قرار گیری، افزایش میزان وزن مولکولی و تعداد حلقه های ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای کاهش می یابد.

جدول ۴-۱۲-۱۳ میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرارگیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

در صد همولیز گلبول قرمز														
NaCl % ↓	N								AC					
	→ آلاینده								F		A		C	
	→ غلظت								F		A		C	
	→ زمان (ساعت)								F		A		C	
	۱ شاهد ↓	۲ شاهد ↓	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴
۰	۱۰۰	۱۰۰	nd	nd	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۲	۹۴/۲±۲/۲	۹۶/۳±۲/۱	nd	nd	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۳/۲±۱/۰ ^{cd}	۸۳/۹±۱/۱ ^{cd}	۹۷/۰±۰/۹	۹۷/۷±۰/۸	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۳/۸ ±۱/۱ ^{cd}	۸۴/۷±۱/۲ ^{cd}
۰/۳	۸۹/۴±۲/۳	۹۱/۵±۲/۴	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۹/۴±۱/۱ ^{cd}	۷۹/۹±۱/۲ ^{cd}	۹۱/۰±۱/۱	۹۱/۶±۱/۰	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۹/۸±۱/۲ ^{cd}	۸۰/۸±۱/۳ ^{cd}
۰/۳۲۵	۸۳/۶±۱/۴	۸۵/۲±۲/۱	nd	nd	۹۵/۲±۱/۳ ^{ab}	۹۸/۲±۱/۰ ^{ab}	۷۳/۴±۱/۳ ^{cd}	۷۴/۰±۱/۲ ^{cd}	۸۳/۹±۱/۰	۸۵/۶±۱/۰	۹۶/۲±۱/۱ ^{ab}	۹۸/۲±۰/۷ ^{ab}	۷۳/۹±۱/۲ ^{cd}	۷۴/۷±۱/۴ ^{cd}
۰/۳۵	۷۵/۷±۲/۲	۷۶/۵±۲/۳	nd	nd	۸۹/۵±۲/۳ ^{ab}	۹۱/۴±۱/۳ ^{ab}	۶۵/۴±۱/۰ ^{cd}	۶۶/۵±۱/۱ ^{cd}	۷۵/۹±۱/۳	۷۶/۹±۱/۲	۹۰/۵±۱/۰ ^{ab}	۹۳/۳±۱/۱ ^{ab}	۶۶/۰±۱/۲ ^{cd}	۶۷/۰±۱/۳ ^{cd}
۰/۳۷۵	۷۰/۸±۱/۳	۷۱/۶±۱/۵	nd	nd	۸۵/۶±۱/۵ ^{ab}	۸۶/۶±۱/۰ ^{ab}	۵۹/۷±۱/۱ ^{cd}	۶۰/۴±۱/۱ ^{cd}	۷۱/۱±۱/۱	۷۲/۱±۱/۲	۸۶/۰±۱/۵ ^{ab}	۸۷/۶±۱/۰ ^{ab}	۶۰/۳±۱/۲ ^{cd}	۶۱/۰±۱/۳ ^{cd}
۰/۴	۶۲/۲±۲/۲	۶۳/۲±۱/۹	nd	nd	۸۰/۲±۱/۵ ^{ab}	۸۳/۲±۱/۷ ^{ab}	۵۲/۸±۱/۲ ^{cd}	۵۳/۴±۱/۴ ^{cd}	۶۳/۰±۱/۲	۶۳/۷±۱/۳	۸۱/۲±۱/۳ ^{ab}	۸۴/۲±۱/۲ ^{ab}	۵۳/۲±۱/۳ ^{cd}	۵۴/۰±۱/۱ ^{cd}
۰/۴۲۵	۵۶/۲±۲/۳	۵۷/۵±۱/۸	nd	nd	۷۵/۵±۱/۰ ^{ab}	۷۶/۵±۱/۳ ^{ab}	۴۶/۴±۱/۳ ^{cd}	۴۷/۰±۱/۴ ^{cd}	۵۶/۹±۱/۲	۵۷/۹±۱/۳	۷۶/۰±۱/۱ ^{ab}	۷۷/۵±۱/۲ ^{ab}	۴۶/۸±۱/۲ ^{cd}	۴۷/۸±۱/۳ ^{cd}
۰/۴۵	۴۸/۴±۱/۲	۴۹/۳±۱/۴	nd	nd	۷۰/۳±۱/۳ ^{ab}	۷۱/۳±۱/۴ ^{ab}	۳۸/۱±۱/۲ ^{cd}	۳۸/۷±۱/۱ ^{cd}	۴۸/۸±۱/۲	۴۹/۸±۱/۱	۷۱/۰±۱/۱ ^{ab}	۷۳/۳±۱/۴ ^{ab}	۳۸/۸±۱/۳ ^{cd}	۳۹/۵±۱/۲ ^{cd}
۰/۴۷۵	۴۰/۲±۱/۲	۴۱/۱±۱/۰	nd	nd	۶۵/۱±۱/۲ ^{ab}	۶۷/۱±۱/۳ ^{ab}	۳۰/۳±۱/۴ ^{cd}	۳۰/۷±۱/۳ ^{cd}	۴۰/۷±۱/۰	۴۱/۷±۱/۱	۶۶/۱±۱/۰ ^{ab}	۶۸/۱±۱/۰ ^{ab}	۳۰/۹±۱/۱ ^{cd}	۳۱/۵±۱/۲ ^{cd}
۰/۵	۳۲/۳±۱/۱	۳۳/۱±۱/۳	nd	nd	۶۰/۱±۱/۰ ^{ab}	۶۲/۱±۱/۶ ^{ab}	۲۲/۲±۱/۲ ^{cd}	۲۲/۷±۱/۰ ^{cd}	۳۲/۹±۱/۱	۳۳/۷±۱/۰	۶۱/۱±۱/۱ ^{ab}	۶۳/۱±۱/۵ ^{ab}	۲۲/۹±۱/۳ ^{cd}	۲۳/۵±۱/۰ ^{cd}
۰/۵۵	۲۲/۲±۱/۱	۲۴/۳±۱/۶	nd	nd	۵۲/۰±۱/۰ ^{ab}	۵۳/۳±۱/۱ ^{ab}	۱۲/۸±۱/۴ ^{cd}	۱۳/۳±۱/۲ ^{cd}	۲۳/۰±۱/۲	۲۴/۲±۱/۲	۵۲/۶±۱/۶ ^{ab}	۵۵/۳±۱/۷ ^{ab}	۱۳/۵±۱/۱ ^{cd}	۱۴/۰±۱/۳ ^{cd}
۰/۶	۱۷/۱±۱/۳	۱۹/۴±۱/۷	nd	nd	۴۵/۴±۱/۷ ^{ab}	۴۷/۴±۱/۱ ^{ab}	۸/۶±۱/۰ ^{cd}	۹/۰±۱/۳ ^{cd}	۱۷/۸±۱/۲	۱۹/۹±۱/۱	۴۶/۴±۱/۴ ^{ab}	۴۸/۴±۱/۰ ^{ab}	۹/۲±۱/۲ ^{cd}	۱۱/۰±۱/۲ ^{cd}
۰/۶۵	۱۱/۷±۰/۸	۱۳/۱±۰/۷	nd	nd	۳۶/۷±۱/۲ ^{ab}	۳۸/۱±۱/۱ ^{ab}	۲/۲±۰/۵ ^{cd}	۲/۶±۰/۳ ^{cd}	۱۲/۱±۱/۲	۱۳/۸±۱/۲	۳۷/۴±۱/۰ ^{ab}	۴۰/۱±۱/۲ ^{ab}	۲/۷±۰/۲ ^{cd}	۳/۲±۰/۷ ^{cd}
۰/۷۵	۷/۵±۰/۷	۸/۷±۰/۵	nd	nd	۲۴/۴±۱/۵ ^{ab}	۲۵/۷±۱/۲ ^{ab}	. ^{cd}	. ^{cd}	۷/۹±۰/۵	۹/۱±۰/۸	۲۵/۰±۱/۲ ^{ab}	۲۷/۷±۱/۱ ^{ab}	. ^{cd}	. ^{cd}
۰/۸۵	۲/۲±۰/۴	۳/۳±۰/۶	nd	nd	۱۳/۳±۱/۱ ^{ab}	۱۴/۵±۱/۲ ^{ab}	.	.	۳/۰±۰/۷	۳/۷±۰/۸	۱۴/۰±۱/۱ ^{ab}	۱۶/۳±۱/۳ ^{ab}	.	.

a: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۱; b: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۲; c: کاهش معنی دار نسبت به شاهد ۱; d: کاهش معنی دار نسبت به محیط; A: غلظت حاد; C: غلظت مزمن.

ادامه جدول ۴-۱۲-۱۳ میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرارگیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

در صد همولیز گلبول قرمز														
NaCl % ↓	ACE								F					
	→ آلاینده													
	→ غلظت		F		A		C		F		A		C	
	→ زمان (ساعت)		۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴
	↓ شاهد ۱	↓ شاهد ۲												
۰	۱۰۰	۱۰۰	nd	nd	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۲	۹۴/۲±۲/۲	۹۶/۳±۲/۱	nd	nd	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۴/۵±۱/۰ ^{cd}	۸۵/۴±۱/۱ ^{cd}	۹۷/۵±۰/۵	۹۸/۱±۰/۶	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۵/۰±۱/۱ ^{cd}	۸۵/۹±۱/۳ ^{cd}
۰/۳	۸۹/۴±۲/۳	۹۱/۵±۲/۴	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۰/۶±۱/۱ ^{cd}	۸۱/۴±۱/۲ ^{cd}	۹۱/۳±۱/۰	۹۲/۰±۱/۰	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۱/۱±۱/۱ ^{cd}	۸۱/۹±۱/۱ ^{cd}
۰/۳۲۵	۸۳/۶±۱/۴	۸۵/۲±۲/۱	nd	nd	۹۷/۲±۱/۲ ^{ab}	۹۸/۹±۰/۶ ^{ab}	۷۴/۵±۱/۲ ^{cd}	۷۵/۳±۱/۲ ^{cd}	۸۳/۴±۱/۱	۸۶/۰±۱/۰	۹۸/۲±۱/۳ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۵/۰±۱/۰ ^{cd}	۷۵/۸±۱/۰ ^{cd}
۰/۳۵	۷۵/۷±۲/۲	۷۶/۵±۲/۳	nd	nd	۹۱/۲±۱/۰ ^{ab}	۹۳/۹±۱/۰ ^{ab}	۶۶/۵±۱/۱ ^{cd}	۶۷/۷±۱/۲ ^{cd}	۷۶/۶±۱/۲	۷۷/۵±۱/۱	۹۲/۰±۱/۲ ^{ab}	۹۴/۴±۱/۰ ^{ab}	۶۷/۱±۱/۲ ^{cd}	۶۸/۲±۱/۱ ^{cd}
۰/۳۷۵	۷۰/۸±۱/۳	۷۱/۶±۱/۵	nd	nd	۸۶/۶±۱/۲ ^{ab}	۸۸/۳±۱/۱ ^{ab}	۶۰/۸±۱/۰ ^{cd}	۶۱/۸±۱/۰ ^{cd}	۷۱/۷±۱/۲	۷۲/۸±۱/۳	۸۷/۴±۱/۳ ^{ab}	۸۹/۴±۱/۴ ^{ab}	۶۱/۶±۱/۱ ^{cd}	۶۲/۹±۱/۱ ^{cd}
۰/۴	۶۲/۲±۲/۲	۶۳/۲±۱/۹	nd	nd	۸۱/۹±۱/۱ ^{ab}	۸۴/۹±۱/۰ ^{ab}	۵۳/۹±۱/۱ ^{cd}	۵۴/۷±۱/۲ ^{cd}	۶۳/۵±۱/۱	۶۴/۲±۱/۲	۸۲/۶±۱/۳ ^{ab}	۸۵/۴±۱/۲ ^{ab}	۵۴/۴±۱/۱ ^{cd}	۵۵/۱±۱/۰ ^{cd}
۰/۴۲۵	۵۶/۲±۲/۳	۵۷/۵±۱/۸	nd	nd	۷۶/۶±۱/۲ ^{ab}	۷۸/۰±۱/۱ ^{ab}	۴۷/۵±۱/۳ ^{cd}	۴۸/۴±۱/۲ ^{cd}	۵۷/۵±۱/۳	۵۸/۴±۱/۲	۷۷/۲±۱/۱ ^{ab}	۷۹/۸±۱/۴ ^{ab}	۴۸/۰±۱/۲ ^{cd}	۴۸/۹±۱/۱ ^{cd}
۰/۴۵	۴۸/۴±۱/۲	۴۹/۳±۱/۴	nd	nd	۷۱/۵±۱/۰ ^{ab}	۷۴/۰±۱/۰ ^{ab}	۳۹/۶±۱/۱ ^{cd}	۴۰/۰±۱/۱ ^{cd}	۴۹/۵±۱/۱	۵۰/۳±۱/۲	۷۲/۸±۱/۳ ^{ab}	۷۵/۷±۱/۰ ^{ab}	۴۰/۱±۱/۲ ^{cd}	۴۰/۸±۱/۲ ^{cd}
۰/۴۷۵	۴۰/۲±۱/۲	۴۱/۱±۱/۰	nd	nd	۶۶/۹±۱/۱ ^{ab}	۶۸/۹±۱/۲ ^{ab}	۳۱/۷±۱/۰ ^{cd}	۳۲/۲±۱/۳ ^{cd}	۴۱/۶±۱/۲	۴۲/۲±۱/۲	۶۷/۴±۱/۳ ^{ab}	۶۹/۳±۱/۲ ^{ab}	۳۲/۴±۱/۱ ^{cd}	۳۲/۵±۱/۰ ^{cd}
۰/۵	۳۲/۳±۱/۱	۳۳/۱±۱/۳	nd	nd	۶۱/۹±۱/۰ ^{ab}	۶۳/۸±۱/۱ ^{ab}	۲۳/۶±۱/۲ ^{cd}	۲۴/۰±۱/۰ ^{cd}	۳۳/۵±۱/۲	۳۴/۲±۱/۱	۶۲/۶±۱/۰ ^{ab}	۶۴/۲±۱/۱ ^{ab}	۲۴/۱±۱/۰ ^{cd}	۲۴/۶±۱/۱ ^{cd}
۰/۵۵	۲۲/۲±۱/۱	۲۴/۳±۱/۶	nd	nd	۵۳/۲±۱/۱ ^{ab}	۵۵/۹±۱/۲ ^{ab}	۱۴/۱±۱/۰ ^{cd}	۱۴/۶±۱/۱ ^{cd}	۲۳/۵±۱/۳	۲۴/۶±۱/۰	۵۴/۳±۱/۶ ^{ab}	۵۶/۸±۱/۳ ^{ab}	۱۴/۷±۱/۱ ^{cd}	۱۵/۲±۱/۲ ^{cd}
۰/۶	۱۷/۱±۱/۳	۱۹/۴±۱/۷	nd	nd	۴۶/۹±۱/۳ ^{ab}	۴۸/۹±۱/۲ ^{ab}	۹/۸±۱/۱ ^{cd}	۱۰/۵±۱/۰ ^{cd}	۱۸/۶±۱/۱	۲۰/۳±۱/۰	۴۷/۴±۱/۱ ^{ab}	۴۹/۸±۱/۰ ^{ab}	۱۰/۶±۱/۱ ^{cd}	۱۱/۱±۱/۱ ^{cd}
۰/۶۵	۱۱/۷±۰/۸	۱۳/۱±۰/۷	nd	nd	۳۷/۸±۱/۱ ^{ab}	۴۰/۹±۱/۲ ^{ab}	۳/۴±۰/۳ ^{cd}	۳/۸±۰/۵ ^{cd}	۱۲/۶±۱/۱	۱۴/۳±۱/۳	۳۸/۶±۱/۲ ^{ab}	۴۱/۷±۱/۳ ^{ab}	۴/۰±۰/۶ ^{cd}	۴/۶±۰/۷ ^{cd}
۰/۷۵	۷/۵±۰/۷	۸/۷±۰/۵	nd	nd	۲۵/۶±۱/۰ ^{ab}	۲۸/۳±۱/۲ ^{ab}	۰ ^{cd}	۰/۷±۰/۴ ^{cd}	۸/۵±۰/۶	۹/۷±۰/۷	۲۶/۷±۱/۴ ^{ab}	۲۹/۴±۱/۱ ^{ab}	۰/۶±۰/۱ ^{cd}	۱/۱±۰/۳ ^{cd}
۰/۸۵	۲/۲±۰/۴	۳/۳±۰/۶	nd	nd	۱۴/۶±۱/۲ ^{ab}	۱۶/۹±۱/۲ ^{ab}	۰	۰	۳/۵±۰/۶	۴/۱±۰/۶	۱۵/۹±۱/۰ ^{ab}	۱۷/۸±۱/۳ ^{ab}	۰	۰

a: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۱ ; b: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۲ ; c: کاهش معنی دار نسبت به شاهد ۱ ; d : کاهش معنی دار نسبت به محیط ; A: غلظت حاد; C: غلظت مزمن.

ادامه جدول ۴-۱۲-۱۳ میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرارگیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

در صد همولیز گلبول قرمز														
NaCl % ↓	Ph								A					
	→ آلاینده													
	→ غلظت		F		A		C		F		A		C	
	→ زمان (ساعت)		۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴
	شاهد ۱ ↓	شاهد ۲ ↓												
۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	nd	nd	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۲	۹۴/۲±۲/۲	۹۶/۳±۲/۱	۹۸/۰±۰/۷	۹۸/۹±۰/۷ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۵/۸±۱/۰ ^{cd}	۸۶/۹±۱/۱ ^{cd}	nd	nd	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۶/۵±۱/۱ ^{cd}	۸۷/۴±۱/۱ ^{cd}
۰/۳	۸۹/۴±۲/۳	۹۱/۵±۲/۴	۹۱/۸±۱/۱	۹۲/۷±۱/۲	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۱/۸±۱/۲ ^{cd}	۸۲/۷±۱/۰ ^{cd}	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۲/۴±۱/۰ ^{cd}	۸۳/۳±۱/۱ ^{cd}
۰/۳۲۵	۸۳/۶±۱/۴	۸۵/۲±۲/۱	۸۳/۹±۱/۰	۸۶/۷±۱/۱	۹۹/۷±۰/۲ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۵/۶±۱/۱ ^{cd}	۷۶/۸±۱/۲ ^{cd}	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۶/۴±۱/۲ ^{cd}	۷۷/۴±۱/۰ ^{cd}
۰/۳۵	۷۵/۷±۲/۲	۷۶/۵±۲/۳	۷۷/۰±۱/۱	۷۷/۹±۱/۰	۹۳/۲±۱/۱ ^{ab}	۹۵/۳±۱/۲ ^{ab}	۶۷/۷±۱/۰ ^{cd}	۶۸/۷±۱/۳ ^{cd}	nd	nd	۹۴/۳±۱/۲	۹۶/۴±۱/۳ ^{ab}	۶۸/۴±۱/۱ ^{cd}	۶۹/۲±۱/۱ ^{cd}
۰/۳۷۵	۷۰/۸±۱/۳	۷۱/۶±۱/۵	۷۲/۳±۱/۱	۷۳/۴±۱/۲	۸۸/۳±۱/۱ ^{ab}	۹۰/۲±۱/۳ ^{ab}	۶۲/۳±۱/۲ ^{cd}	۶۳/۶±۱/۰ ^{cd}	nd	nd	۸۹/۴±۱/۲ ^{ab}	۹۱/۳±۱/۲ ^{ab}	۶۳/۱±۱/۰ ^{cd}	۶۴/۰±۱/۲ ^{cd}
۰/۴	۶۲/۲±۲/۲	۶۳/۲±۱/۹	۶۴/۰±۱/۲	۶۴/۹±۱/۱	۸۳/۵±۱/۲ ^{ab}	۸۶/۶±۱/۱ ^{ab}	۵۵/۰±۱/۰ ^{cd}	۵۵/۶±۱/۱ ^{cd}	nd	nd	۸۴/۴±۱/۱ ^{ab}	۸۷/۴±۱/۳ ^{ab}	۵۵/۴±۱/۱ ^{cd}	۵۶/۲±۱/۱ ^{cd}
۰/۴۲۵	۵۶/۲±۲/۳	۵۷/۵±۱/۸	۵۸/۰±۱/۱	۵۸/۹±۱/۳	۷۸/۳±۱/۰ ^{ab}	۸۰/۳±۱/۲ ^{ab}	۴۸/۸±۱/۱ ^{cd}	۴۹/۷±۱/۲ ^{cd}	nd	nd	۷۹/۲±۱/۲ ^{ab}	۸۱/۴±۱/۱ ^{ab}	۴۹/۴±۱/۲ ^{cd}	۵۰/۰±۱/۲ ^{cd}
۰/۴۵	۴۸/۴±۱/۲	۴۹/۳±۱/۴	۵۰/۰±۱/۰	۵۰/۹±۱/۱	۷۳/۷±۱/۴ ^{ab}	۷۶/۷±۱/۰ ^{ab}	۴۰/۷±۱/۱ ^{cd}	۴۱/۲±۱/۰ ^{cd}	nd	nd	۷۴/۶±۱/۳ ^{ab}	۷۷/۳±۱/۲ ^{ab}	۴۱/۳±۱/۰ ^{cd}	۴۱/۹±۱/۱ ^{cd}
۰/۴۷۵	۴۰/۲±۱/۲	۴۱/۱±۱/۰	۴۲/۰±۱/۲	۴۲/۹±۱/۳	۶۸/۳±۱/۲ ^{ab}	۷۰/۲±۱/۳ ^{ab}	۳۲/۷±۱/۲ ^{cd}	۳۳/۰±۱/۱ ^{cd}	nd	nd	۶۹/۲±۱/۰ ^{ab}	۷۱/۳±۱/۱ ^{ab}	۳۳/۲±۱/۱ ^{cd}	۳۳/۶±۱/۲ ^{cd}
۰/۵	۳۲/۳±۱/۱	۳۳/۱±۱/۳	۳۴/۰±۱/۲	۳۴/۹±۱/۲	۶۳/۷±۱/۰ ^{ab}	۶۵/۳±۱/۲ ^{ab}	۲۴/۸±۱/۱ ^{cd}	۲۵/۱±۱/۲ ^{cd}	nd	nd	۶۴/۶±۱/۲ ^{ab}	۶۶/۲±۱/۳ ^{ab}	۲۵/۳±۱/۰ ^{cd}	۲۵/۷±۱/۱ ^{cd}
۰/۵۵	۲۲/۲±۱/۱	۲۴/۳±۱/۶	۲۴/۰±۱/۲	۲۵/۰±۱/۱	۵۵/۴±۱/۴ ^{ab}	۵۷/۹±۱/۲ ^{ab}	۱۵/۲±۱/۰ ^{cd}	۱۵/۸±۱/۱ ^{cd}	nd	nd	۵۶/۶±۱/۳ ^{ab}	۵۸/۸±۱/۳ ^{ab}	۱۶/۰±۱/۲ ^{cd}	۱۶/۶±۱/۲ ^{cd}
۰/۶	۱۷/۱±۱/۳	۱۹/۴±۱/۷	۱۹/۰±۱/۰	۲۰/۹±۱/۰	۴۸/۳±۱/۲ ^{ab}	۵۰/۷±۱/۱ ^{ab}	۱۱/۰±۱/۲ ^{cd}	۱۱/۴±۱/۲ ^{cd}	nd	nd	۴۹/۲±۱/۱ ^{ab}	۵۱/۸±۱/۲ ^{ab}	۱۱/۵±۱/۰ ^{cd}	۱۲/۱±۱/۱ ^{cd}
۰/۶۵	۱۱/۷±۰/۸	۱۳/۱±۰/۷	۱۳/۱±۱/۲	۱۴/۹±۱/۱	۳۹/۴±۱/۳ ^{ab}	۴۲/۴±۱/۲ ^{ab}	۴/۷±۰/۴ ^{cd}	۵/۱±۰/۸ ^{cd}	nd	nd	۴۰/۳±۱/۴ ^{ab}	۴۳/۶±۱/۴ ^{ab}	۵/۳±۰/۳ ^{cd}	۶/۰±۰/۷ ^{cd}
۰/۷۵	۷/۵±۰/۷	۸/۷±۰/۵	۹/۰±۰/۷	۱۰/۳±۰/۶	۲۷/۴±۱/۱ ^{ab}	۳۰/۶±۱/۲ ^{ab}	۱/۱±۰/۴ ^{cd}	۱/۵±۰/۴ ^{cd}	nd	nd	۲۸/۳±۱/۲ ^{ab}	۳۱/۲±۱/۳ ^{ab}	۱/۷±۰/۵ ^{cd}	۲/۱±۰/۲ ^{cd}
۰/۸۵	۲/۲±۰/۴	۳/۳±۰/۶	۳/۹±۰/۵	۴/۷±۰/۵	۱۶/۷±۱/۲ ^{ab}	۱۸/۳±۱/۰ ^{ab}	.	.	nd	nd	۱۷/۸±۱/۱ ^{ab}	۱۹/۶±۱/۲ ^{ab}	.	.

a: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۱; b: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۲; c: کاهش معنی دار نسبت به شاهد ۱; d: کاهش معنی دار نسبت به محیط A; غلظت حاد; C: غلظت مزمن.

ادامه جدول ۴-۱۲-۱۳ میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرارگیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

در صد همولیز گلبول قرمز														
NaCl % ↓	FI								Py					
	→ آلاینده													
	→ غلظت		F		A		C		F		A		C	
	→ زمان (ساعت)		۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴
	↓ شاهد ۱	↓ شاهد ۲												
۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۲	۹۴/۲±۲/۲	۹۶/۳±۲/۱	۹۸/۵±۰/۷ ^a	۹۹/۵±۰/۳ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۷/۰±۱/۲ ^{cd}	۸۸/۰±۱/۱ ^{cd}	۹۹/۱±۰/۶ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۷/۸±۱/۱ ^{cd}	۸۸/۸±۱/۲ ^{cd}
۰/۳	۸۹/۴±۲/۳	۹۱/۵±۲/۴	۹۲/۴±۱/۰	۹۳/۴±۱/۱ ^a	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۳/۰±۱/۱ ^{cd}	۸۳/۹±۱/۰ ^{cd}	۹۲/۹±۱/۱	۹۳/۸±۱/۲ ^a	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۳/۷±۱/۰ ^{cd}	۸۴/۵±۱/۲ ^{cd}
۰/۳۲۵	۸۳/۶±۱/۴	۸۵/۷±۲/۱	۸۴/۵±۱/۰	۸۷/۳±۱/۰	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۷/۰±۱/۱ ^{cd}	۷۸/۰±۱/۲ ^{cd}	۸۵/۰±۱/۱	۸۷/۹±۱/۱ ^a	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۷/۶±۱/۲ ^{cd}	۷۸/۵±۱/۱ ^{cd}
۰/۳۵	۷۵/۷±۲/۲	۷۶/۵±۲/۳	۷۷/۵±۱/۲	۷۸/۳±۱/۰	۹۵/۴±۱/۱ ^{ab}	۹۷/۵±۱/۱ ^{ab}	۶۹/۰±۱/۲ ^{cd}	۶۹/۸±۱/۰ ^{cd}	۷۸/۰±۱/۱	۷۸/۹±۱/۰	۹۶/۱±۱/۲	۹۸/۹±۱/۰	۶۹/۵±۱/۰ ^{cd}	۷۰/۲±۱/۱ ^{cd}
۰/۳۷۵	۷۰/۸±۱/۳	۷۱/۶±۱/۵	۷۲/۸±۱/۲	۷۳/۹±۱/۱	۹۰/۲±۱/۳ ^{ab}	۹۲/۴±۱/۳ ^{ab}	۶۳/۹±۱/۱ ^{cd}	۶۴/۸±۱/۱ ^{cd}	۷۳/۵±۱/۱	۷۴/۴±۱/۲	۹۱/۲±۱/۱ ^{ab}	۹۳/۴±۱/۲ ^{ab}	۶۴/۲±۱/۲ ^{cd}	۶۵/۳±۱/۲ ^{cd}
۰/۴	۶۲/۲±۲/۲	۶۳/۲±۱/۹	۶۴/۶±۱/۱	۶۵/۵±۱/۱	۸۵/۵±۱/۲ ^{ab}	۸۸/۳±۱/۲ ^{ab}	۵۶/۰±۱/۲ ^{cd}	۵۶/۹±۱/۲ ^{cd}	۶۵/۱±۱/۱	۶۶/۰±۱/۰	۸۶/۴±۱/۰ ^{ab}	۸۹/۹±۱/۳ ^{ab}	۵۶/۷±۱/۰ ^{cd}	۵۷/۶±۱/۱ ^{cd}
۰/۴۲۵	۵۶/۲±۲/۳	۵۷/۵±۱/۸	۵۸/۶±۱/۲	۵۹/۵±۱/۳	۸۰/۳±۱/۱ ^{ab}	۸۲/۳±۱/۲ ^{ab}	۴۹/۹±۱/۱ ^{cd}	۵۰/۸±۱/۰ ^{cd}	۵۹/۲±۱/۰	۶۰/۰±۱/۱	۸۱/۴±۱/۲ ^{ab}	۸۳/۷±۱/۱ ^{ab}	۵۰/۵±۱/۰ ^{cd}	۵۱/۲±۱/۱ ^{cd}
۰/۴۵	۴۸/۴±۱/۲	۴۹/۳±۱/۴	۵۰/۷±۱/۱	۵۱/۵±۱/۰	۷۵/۳±۱/۲ ^{ab}	۷۸/۲±۱/۱ ^{ab}	۴۱/۷±۱/۱ ^{cd}	۴۲/۳±۱/۲ ^{cd}	۵۱/۲±۱/۲	۵۲/۰±۱/۱	۷۶/۴±۱/۰ ^{ab}	۷۹/۲±۱/۲ ^{ab}	۴۲/۵±۱/۲ ^{cd}	۴۲/۹±۱/۱ ^{cd}
۰/۴۷۵	۴۰/۲±۱/۲	۴۱/۱±۱/۰	۴۲/۶±۱/۲	۴۳/۴±۱/۲	۷۰/۳±۱/۲ ^{ab}	۷۲/۴±۱/۳ ^{ab}	۳۳/۷±۱/۲ ^{cd}	۳۴/۱±۱/۰ ^{cd}	۴۳/۲±۱/۱	۴۳/۹±۱/۱	۷۱/۴±۱/۱ ^{ab}	۷۳/۱±۱/۴ ^{ab}	۳۴/۳±۱/۰ ^{cd}	۳۴/۹±۱/۱ ^{cd}
۰/۵	۳۲/۳±۱/۱	۳۳/۱±۱/۳	۳۴/۵±۱/۱	۳۵/۴±۱/۱	۶۵/۷±۱/۰ ^{ab}	۶۷/۲±۱/۲ ^{ab}	۲۵/۸±۱/۱ ^{cd}	۲۶/۲±۱/۲ ^{cd}	۳۵/۰±۱/۲	۳۵/۹±۱/۲	۶۶/۸±۱/۱ ^{ab}	۶۸/۴±۱/۳ ^{ab}	۲۶/۴±۱/۲ ^{cd}	۲۷/۹±۱/۰ ^d
۰/۵۵	۲۲/۲±۱/۱	۲۴/۳±۱/۶	۲۴/۷±۱/۲	۲۵/۶±۱/۲	۵۷/۵±۱/۲ ^{ab}	۵۹/۸±۱/۱ ^{ab}	۱۶/۷±۱/۰ ^{cd}	۱۷/۲±۱/۱ ^{cd}	۲۵/۲±۱/۰	۲۶/۰±۱/۰	۵۸/۶±۱/۱ ^{ab}	۶۰/۱±۱/۲ ^{ab}	۱۷/۳±۱/۱ ^{cd}	۱۸/۰±۱/۰ ^{cd}
۰/۶	۱۷/۱±۱/۳	۱۹/۴±۱/۷	۱۹/۵±۱/۱	۲۰/۴±۱/۰	۵۰/۳±۱/۰ ^{ab}	۵۲/۴±۱/۳ ^{ab}	۱۲/۰±۱/۰ ^{cd}	۱۲/۵±۱/۲ ^{cd}	۲۰/۰±۱/۲	۲۰/۸±۱/۱	۵۱/۴±۱/۰ ^{ab}	۵۳/۴±۱/۲ ^{ab}	۱۳/۰±۱/۱ ^{cd}	۱۳/۴±۱/۳ ^{cd}
۰/۶۵	۱۱/۷±۰/۸	۱۳/۱±۰/۷	۱۳/۹±۱/۲	۱۵/۵±۱/۲	۴۱/۲±۱/۲ ^{ab}	۴۴/۵±۱/۲ ^{ab}	۶/۰±۰/۴ ^{cd}	۶/۴±۰/۶ ^{cd}	۱۴/۵±۱/۱	۱۵/۶±۱/۱	۴۲/۳±۱/۳ ^{ab}	۴۵/۴±۱/۰ ^{ab}	۶/۵±۰/۳ ^{cd}	۷/۰±۰/۴ ^{cd}
۰/۷۵	۷/۵±۰/۷	۸/۷±۰/۵	۹/۷±۰/۶	۱۰/۸±۰/۵	۲۹/۲±۱/۱ ^{ab}	۳۲/۳±۱/۰ ^{ab}	۲/۱±۰/۴ ^{cd}	۲/۵±۰/۳ ^{cd}	۱۰/۴±۰/۶	۱۱/۳±۰/۴	۳۰/۱±۱/۰ ^{ab}	۳۳/۶±۱/۱ ^{ab}	۲/۶±۰/۳ ^{cd}	۲/۹±۰/۴ ^{cd}
۰/۸۵	۲/۲±۰/۴	۳/۳±۰/۶	۴/۴±۰/۴	۵/۳±۰/۶	۱۸/۶±۱/۲ ^{ab}	۲۰/۲±۱/۳ ^{ab}	.	.	۴/۹±۰/۳	۵/۹±۰/۴	۱۹/۷±۱/۳ ^{ab}	۲۱/۸±۱/۴ ^{ab}	.	.

a: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۱ ; b: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۲; c: کاهش معنی دار نسبت به شاهد ۲; F: غلظت نزدیک به محیط; A: غلظت حاد; C: غلظت مزمن.

ادامه جدول ۴-۱۲-۱۳ میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرارگیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

در صد همولیز گلبول قرمز														
NaCl % ↓	B(a)A								Ch					
	→ آلاینده								F		A		C	
	→ غلظت		F		A		C		F		A		C	
	→ زمان (ساعت)		۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴
	↓ شاهد ۱	↓ شاهد ۲												
۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۲	۹۴/۲±۲/۲	۹۶/۳±۲/۱	۹۹/۶±۰/۵ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۸/۷±۱/۲ ^{cd}	۸۹/۸±۱/۱ ^{cd}	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۸۹/۵±۱/۱ ^{cd}	۹۰/۵±۱/۲ ^d
۰/۳	۸۹/۴±۲/۳	۹۱/۵±۲/۴	۹۳/۵±۱/۲	۹۴/۳±۱/۱ ^a	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۴/۳±۱/۱ ^{cd}	۸۵/۷±۱/۱ ^{cd}	۹۴/۰±۱/۱ ^a	۹۴/۹±۱/۰ ^a	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۵/۰±۱/۲ ^{cd}	۸۶/۴±۱/۲ ^d
۰/۳۲۵	۸۳/۶±۱/۴	۸۵/۲±۲/۱	۸۵/۵±۱/۱	۸۷/۶±۱/۰ ^a	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۸/۳±۱/۰ ^{cd}	۷۹/۶±۱/۲ ^{cd}	۸۶/۰±۱/۲	۸۷/۹±۱/۲ ^a	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۸/۹±۱/۱ ^{cd}	۸۰/۴±۱/۱ ^d
۰/۳۵	۷۵/۷±۲/۲	۷۶/۵±۲/۳	۷۸/۵±۱/۲	۷۹/۷±۱/۱ ^a	۹۷/۲±۱/۳ ^{ab}	۹۹/۳±۰/۷ ^{ab}	۷۰/۱±۱/۱ ^{cd}	۷۱/۳±۱/۲ ^{cd}	۷۹/۰±۱/۱	۸۰/۰±۱/۲ ^a	۹۸/۱±۱/۲ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۱/۰±۱/۲ ^{cd}	۷۲/۰±۱/۰ ^d
۰/۳۷۵	۷۰/۸±۱/۳	۷۱/۶±۱/۵	۷۴/۰±۱/۲	۷۴/۸±۱/۱ ^a	۹۲/۱±۱/۲ ^{ab}	۹۴/۵±۱/۳ ^{ab}	۶۵/۰±۱/۱ ^{cd}	۶۶/۲±۱/۲ ^{cd}	۷۴/۵±۱/۱	۷۵/۵±۱/۲ ^a	۹۳/۲±۱/۱ ^{ab}	۹۵/۴±۱/۲ ^{ab}	۶۵/۸±۱/۰ ^{cd}	۶۶/۹±۱/۱ ^d
۰/۴	۶۲/۲±۲/۲	۶۳/۲±۱/۹	۶۵/۷±۱/۰	۶۶/۴±۱/۱ ^a	۸۷/۲±۱/۱ ^{ab}	۹۰/۲±۱/۲ ^{ab}	۵۷/۵±۱/۱ ^{cd}	۵۸/۵±۱/۰ ^{cd}	۶۶/۱±۱/۱	۶۶/۹±۱/۲ ^a	۸۸/۳±۱/۲ ^{ab}	۹۱/۳±۱/۱ ^{ab}	۵۸/۰±۱/۲ ^{cd}	۵۹/۲±۱/۱ ^d
۰/۴۲۵	۵۶/۲±۲/۳	۵۷/۵±۱/۸	۵۹/۷±۱/۱	۶۰/۴±۱/۲ ^a	۸۲/۳±۱/۱ ^{ab}	۸۴/۵±۱/۲ ^{ab}	۵۱/۰±۱/۲ ^{cd}	۵۲/۲±۱/۱ ^{cd}	۶۰/۱±۱/۲	۶۰/۹±۱/۱ ^a	۸۳/۳±۱/۰ ^{ab}	۸۵/۶±۱/۳ ^{ab}	۵۱/۵±۱/۱ ^{cd}	۵۳/۰±۱/۱ ^d
۰/۴۵	۴۸/۴±۱/۲	۴۹/۳±۱/۴	۵۱/۷±۱/۱	۵۲/۵±۱/۰ ^a	۷۷/۳±۱/۱ ^{ab}	۸۰/۳±۱/۰ ^{ab}	۴۲/۸±۱/۱ ^{cd}	۴۳/۸±۱/۲ ^{cd}	۵۲/۲±۱/۱	۵۲/۹±۱/۲ ^a	۷۸/۴±۱/۳ ^{ab}	۸۱/۲±۱/۲ ^{ab}	۴۳/۴±۱/۲ ^{cd}	۴۴/۷±۱/۳ ^d
۰/۴۷۵	۴۰/۲±۱/۲	۴۱/۱±۱/۰	۴۳/۷±۱/۲	۴۴/۵±۱/۲ ^a	۷۲/۴±۱/۲ ^{ab}	۷۴/۲±۱/۱ ^{ab}	۳۴/۸±۱/۰ ^{cd}	۳۵/۷±۱/۲ ^{cd}	۴۴/۱±۱/۲	۴۵/۰±۱/۳ ^a	۷۳/۱±۱/۱ ^{ab}	۷۵/۳±۱/۲ ^{ab}	۳۵/۳±۱/۱ ^{cd}	۳۶/۳±۱/۱ ^d
۰/۵	۳۲/۳±۱/۱	۳۳/۱±۱/۳	۳۵/۵±۱/۲	۳۶/۴±۱/۱ ^a	۶۷/۷±۱/۰ ^{ab}	۶۹/۳±۱/۴ ^{ab}	۲۶/۸±۱/۰ ^{cd}	۲۷/۸±۱/۱ ^{cd}	۳۶/۰±۱/۱	۳۶/۹±۱/۲ ^a	۶۸/۹±۱/۲ ^{ab}	۷۰/۲±۱/۳ ^{ab}	۲۷/۵±۱/۱ ^{cd}	۲۸/۵±۱/۲ ^d
۰/۵۵	۲۲/۲±۱/۱	۲۴/۳±۱/۶	۲۵/۶±۱/۱	۲۶/۴±۱/۲ ^a	۵۹/۷±۱/۲ ^{ab}	۶۱/۲±۱/۳ ^{ab}	۱۷/۸±۱/۲ ^{cd}	۱۹/۳±۱/۱ ^{cd}	۲۶/۱±۱/۰	۲۶/۹±۱/۱ ^a	۶۰/۶±۱/۰ ^{ab}	۶۲/۴±۱/۱ ^{ab}	۱۸/۳±۱/۰ ^{cd}	۲۰/۰±۱/۰ ^d
۰/۶	۱۷/۱±۱/۳	۱۹/۴±۱/۷	۲۰/۵±۱/۱	۲۱/۳±۱/۰ ^a	۵۲/۴±۱/۲ ^{ab}	۵۴/۳±۱/۳ ^{ab}	۱۳/۳±۱/۲ ^{cd}	۱۴/۴±۱/۲ ^{cd}	۲۱/۰±۱/۰	۲۱/۹±۱/۱ ^a	۵۳/۵±۱/۱ ^{ab}	۵۵/۴±۱/۲ ^{ab}	۱۳/۸±۱/۱ ^{cd}	۱۵/۰±۱/۱ ^d
۰/۶۵	۱۱/۷±۰/۸	۱۳/۱±۰/۷	۱۵/۰±۱/۲	۱۶/۴±۱/۲ ^a	۴۳/۳±۱/۲ ^{ab}	۴۶/۳±۱/۱ ^{ab}	۶/۹±۰/۲ ^{cd}	۸/۰±۰/۲ ^{cd}	۱۵/۵±۱/۱	۱۷/۰±۱/۳ ^a	۴۴/۳±۱/۱ ^{ab}	۴۷/۲±۱/۰ ^{ab}	۷/۴±۰/۳ ^{cd}	۸/۶±۰/۳ ^d
۰/۷۵	۷/۵±۰/۷	۸/۷±۰/۵	۱۰/۹±۰/۷	۱۱/۹±۰/۵ ^a	۳۱/۲±۱/۱ ^{ab}	۳۴/۶±۱/۲ ^{ab}	۲/۸±۰/۴ ^{cd}	۳/۹±۰/۳ ^{cd}	۱۱/۴±۰/۴	۱۲/۴±۰/۶ ^a	۳۲/۳±۱/۲ ^{ab}	۳۵/۶±۱/۱ ^{ab}	۳/۴±۰/۲ ^{cd}	۴/۴±۰/۴ ^d
۰/۸۵	۲/۴±۰/۴	۳/۳±۰/۶	۵/۴±۰/۴	۶/۴±۰/۵ ^a	۲۰/۴±۱/۲ ^{ab}	۲۳/۳±۱/۴ ^{ab}	۰	۰	۵/۹±۰/۳	۶/۹±۰/۴ ^a	۲۱/۳±۱/۱ ^{ab}	۲۴/۴±۱/۲ ^{ab}	۰	۰

a: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۱; b: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۲; c: کاهش معنی دار نسبت به شاهد ۱; d: کاهش معنی دار نسبت به محیط; A: غلظت حاد; C: غلظت مزمن.

ادامه جدول ۴-۱۲-۱۳ میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرارگیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

در صد همولیز گلبول قرمز														
NaCl % ↓	B(b)FI								B(k)FI					
	→ آلاینده													
	→ غلظت		F		A		C		F		A		C	
	→ زمان (ساعت)		۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴
	شاهد ۱ ↓	شاهد ۲ ↓												
۰	۱۰۰	۱۰۰	nd	nd	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	nd	nd	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۲	۹۴/۲±۲/۲	۹۶/۳±۲/۱	nd	nd	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۹۰/۰±۱/۰ ^{cd}	۹۱/۵±۱/۱ ^d	nd	nd	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۹۰/۴±۱/۲ ^d	۹۲/۰±۱/۰ ^d
۰/۳	۸۹/۴±۲/۳	۹۱/۵±۲/۴	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۵/۴±۱/۱ ^{cd}	۸۶/۹±۱/۱ ^d	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۶/۰±۱/۰ ^d	۸۷/۴±۱/۲ ^d
۰/۳۲۵	۸۳/۶±۱/۴	۸۵/۲±۲/۱	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۹/۴±۱/۲ ^{cd}	۸۰/۹±۱/۲ ^d	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۹/۸±۱/۱ ^d	۸۱/۶±۱/۱
۰/۳۵	۷۵/۷±۲/۲	۷۶/۵±۲/۳	nd	nd	۹۹/۲±۰/۵ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۱/۵±۱/۱ ^{cd}	۷۲/۵±۱/۱ ^d	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۱/۹±۱/۲ ^d	۷۳/۰±۱/۲
۰/۳۷۵	۷۰/۸±۱/۳	۷۱/۶±۱/۵	nd	nd	۹۴/۳±۱/۲ ^{ab}	۹۶/۲±۱/۰ ^{ab}	۶۶/۴±۱/۲ ^{cd}	۶۷/۴±۱/۲ ^d	nd	nd	۹۴/۹±۱/۱ ^{ab}	۹۶/۸±۱/۱ ^{ab}	۶۶/۹±۱/۱ ^d	۶۷/۹±۱/۱
۰/۴	۶۲/۲±۲/۲	۶۳/۹±۱/۹	nd	nd	۸۹/۴±۱/۱ ^{ab}	۹۲/۲±۱/۲ ^{ab}	۵۸/۶±۱/۱ ^d	۵۹/۸±۱/۰ ^d	nd	nd	۸۹/۹±۱/۰ ^{ab}	۹۲/۸±۱/۰ ^{ab}	۵۹/۰±۱/۰ ^d	۶۰/۵±۱/۱
۰/۴۲۵	۵۶/۲±۲/۳	۵۷/۵±۱/۸	nd	nd	۸۴/۴±۱/۱ ^{ab}	۸۶/۴±۱/۱ ^{ab}	۵۲/۰±۱/۲ ^{cd}	۵۳/۵±۱/۰ ^d	nd	nd	۸۵/۰±۱/۲ ^{ab}	۸۶/۹±۱/۰ ^{ab}	۵۲/۴±۱/۱ ^d	۵۴/۰±۱/۱
۰/۴۵	۴۸/۴±۱/۲	۴۹/۳±۱/۴	nd	nd	۷۹/۳±۱/۲ ^{ab}	۸۲/۱±۱/۰ ^{ab}	۴۴/۰±۱/۱ ^{cd}	۴۴/۹±۱/۲ ^d	nd	nd	۷۹/۹±۱/۱ ^{ab}	۸۲/۸±۱/۰ ^{ab}	۴۴/۵±۱/۲ ^d	۴۵/۴±۱/۰
۰/۴۷۵	۴۰/۲±۱/۲	۴۱/۱±۱/۰	nd	nd	۷۴/۲±۱/۰ ^{ab}	۷۶/۲±۱/۳ ^{ab}	۳۵/۹±۱/۲ ^{cd}	۳۶/۹±۱/۳ ^d	nd	nd	۷۴/۹±۱/۱ ^{ab}	۷۷/۲±۱/۰ ^{ab}	۳۶/۴±۱/۱ ^d	۳۷/۴±۱/۲
۰/۵	۳۲/۳±۱/۱	۳۳/۱±۱/۳	nd	nd	۶۹/۷±۱/۱ ^{ab}	۷۱/۳±۱/۰ ^{ab}	۲۸/۰±۱/۲ ^{cd}	۲۸/۹±۱/۱ ^d	nd	nd	۷۰/۲±۱/۰ ^{ab}	۷۱/۹±۱/۱ ^{ab}	۲۸/۴±۱/۱ ^d	۲۹/۵±۱/۳
۰/۵۵	۲۲/۹±۱/۱	۲۴/۳±۱/۶	nd	nd	۶۱/۷±۱/۲ ^{ab}	۶۳/۳±۱/۲ ^{ab}	۱۸/۹±۱/۱ ^{cd}	۲۰/۵±۱/۱	nd	nd	۶۲/۴±۱/۰ ^{ab}	۶۳/۹±۱/۱ ^{ab}	۱۹/۴±۱/۲ ^d	۲۱/۰±۱/۲
۰/۶	۱۷/۱±۱/۳	۱۹/۴±۱/۷	nd	nd	۵۴/۴±۱/۳ ^{ab}	۵۶/۵±۱/۱ ^{ab}	۱۴/۴±۱/۲ ^d	۱۵/۵±۱/۲	nd	nd	۵۵/۰±۱/۴ ^{ab}	۵۷/۰±۱/۰ ^{ab}	۱۴/۹±۱/۱ ^d	۱۶/۰±۱/۱
۰/۶۵	۱۱/۷±۰/۸	۱۳/۱±۰/۷	nd	nd	۴۵/۴±۱/۲ ^{ab}	۴۸/۳±۱/۲ ^{ab}	۷/۸±۰/۱ ^d	۹/۲±۰/۲	nd	nd	۴۵/۹±۱/۰ ^{ab}	۴۸/۸±۱/۱ ^{ab}	۸/۱±۰/۱ ^d	۹/۵±۰/۳
۰/۷۵	۷/۵±۰/۷	۸/۷±۰/۵	nd	nd	۳۳/۴±۱/۳ ^{ab}	۳۶/۷±۱/۲ ^{ab}	۳/۹±۰/۱ ^d	۴/۹±۰/۳	nd	nd	۳۳/۸±۱/۰ ^{ab}	۳۷/۳±۱/۱ ^{ab}	۴/۴±۰/۲ ^d	۵/۴±۰/۲
۰/۸۵	۲/۲±۰/۴	۳/۳±۰/۶	nd	nd	۲۲/۴±۱/۲ ^{ab}	۲۵/۶±۱/۰ ^{ab}	.	.	nd	nd	۲۳/۰±۱/۰ ^{ab}	۲۶/۰±۱/۲ ^{ab}	.	.

a: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۱; b: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۲; c: کاهش معنی دار نسبت به شاهد ۲; F: غلظت نزدیک به محیط; A: غلظت حاد; C: غلظت مزمن.

ادامه جدول ۴-۱۲-۱۳ میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرارگیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

در صد همولیز گلبول قرمز														
NaCl % ↓	B(a)Py								IPY					
	→ آلاینده													
	→ غلظت		F		A		C		F		A		C	
	→ زمان (ساعت)		۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴
	↓ شاهد ۱	↓ شاهد ۲												
۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	nd	nd	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۲	۹۴/۲±۲/۲	۹۶/۳±۲/۱	۹۰/۸±۱/۰ ^d	۹۲/۴±۱/۲	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۹۱/۱±۱/۱ ^d	۹۲/۷±۱/۱	nd	nd	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۹۱/۷±۱/۰ ^d	۹۳/۳±۱/۲
۰/۳	۸۹/۴±۲/۳	۹۱/۵±۲/۴	۸۷/۵±۱/۰ ^d	۸۸/۰±۱/۱	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۶/۷±۱/۱ ^d	۸۸/۱±۱/۰	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۷/۳±۱/۲ ^d	۸۸/۹±۱/۱
۰/۳۲۵	۸۳/۶±۱/۴	۸۵/۲±۲/۱	۸۰/۳±۱/۱ ^d	۸۲/۰±۱/۰	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۰/۷±۱/۲ ^d	۸۲/۳±۱/۲	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۱/۳±۱/۱	۸۲/۹±۱/۰
۰/۳۵	۷۵/۷±۲/۲	۷۷/۵±۲/۳	۷۲/۳±۱/۰ ^d	۷۳/۵±۱/۲	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۲/۶±۱/۱	۷۳/۷±۱/۱	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۳/۲±۱/۲	۷۴/۲±۱/۲
۰/۳۷۵	۷۰/۸±۱/۳	۷۱/۶±۱/۵	۶۷/۴±۱/۱ ^d	۶۸/۳±۱/۲	۹۵/۷±۱/۲ ^{ab}	۹۷/۶±۱/۲ ^{ab}	۶۷/۷±۱/۰	۶۸/۶±۱/۲	nd	nd	۹۶/۵±۱/۱ ^{ab}	۹۸/۱±۱/۳ ^{ab}	۶۸/۳±۱/۱	۶۹/۲±۱/۱
۰/۴	۶۲/۲±۲/۲	۶۳/۲±۱/۹	۵۹/۲±۱/۲ ^d	۶۱/۰±۱/۲	۹۰/۸±۱/۲ ^{ab}	۹۳/۷±۱/۱ ^{ab}	۵۹/۸±۱/۱	۶۱/۲±۱/۰	nd	nd	۹۱/۴±۱/۰ ^{ab}	۹۴/۴±۱/۲ ^{ab}	۶۰/۳±۱/۲	۶۱/۹±۱/۱
۰/۴۲۵	۵۶/۲±۲/۳	۵۷/۵±۱/۸	۵۲/۹±۱/۲ ^d	۵۴/۵±۱/۰	۸۶/۱±۱/۱ ^{ab}	۸۷/۹±۱/۰ ^{ab}	۵۳/۱±۱/۰ ^d	۵۴/۸±۱/۲	nd	nd	۸۷/۲±۱/۲ ^{ab}	۸۸/۹±۱/۱ ^{ab}	۵۳/۹±۱/۱	۵۵/۵±۱/۰
۰/۴۵	۴۸/۴±۱/۲	۴۹/۳±۱/۴	۴۴/۹±۱/۰ ^d	۴۵/۹±۱/۲	۸۰/۷±۱/۰ ^{ab}	۸۳/۱±۱/۱ ^{ab}	۴۵/۳±۱/۱ ^d	۴۶/۱±۱/۱	nd	nd	۸۱/۷±۱/۳ ^{ab}	۸۴/۰±۱/۰ ^{ab}	۴۵/۹±۱/۰	۴۶/۹±۱/۲
۰/۴۷۵	۴۰/۲±۱/۲	۴۱/۱±۱/۰	۳۶/۹±۱/۰ ^d	۳۷/۹±۱/۱	۷۵/۸±۱/۲ ^{ab}	۷۷/۹±۱/۲ ^{ab}	۳۷/۲±۱/۲	۳۸/۲±۱/۰	nd	nd	۷۶/۷±۱/۱ ^{ab}	۷۸/۵±۱/۱ ^{ab}	۳۷/۹±۱/۱	۳۸/۹±۱/۱
۰/۵	۳۲/۳±۱/۱	۳۳/۱±۱/۳	۲۸/۹±۱/۱ ^d	۳۰/۰±۱/۲	۷۱/۳±۱/۱ ^{ab}	۷۲/۹±۱/۲ ^{ab}	۲۹/۳±۱/۲	۳۰/۲±۱/۱	nd	nd	۷۲/۰±۱/۰ ^{ab}	۷۳/۹±۱/۳ ^{ab}	۲۹/۹±۱/۰	۳۰/۹±۱/۲
۰/۵۵	۲۲/۲±۱/۱	۲۴/۳±۱/۶	۱۹/۹±۱/۰ ^d	۲۱/۵±۱/۱	۶۳/۲±۱/۲ ^{ab}	۶۴/۹±۱/۰ ^{ab}	۲۰/۱±۱/۱ ^d	۲۱/۷±۱/۳	nd	nd	۶۴/۰±۱/۰ ^{ab}	۶۵/۹±۱/۱ ^{ab}	۲۰/۸±۱/۲	۲۲/۴±۱/۱
۰/۶	۱۷/۱±۱/۳	۱۹/۴±۱/۷	۱۵/۴±۱/۰ ^d	۱۶/۵±۱/۰	۵۵/۹±۱/۱ ^{ab}	۵۷/۸±۱/۲ ^{ab}	۱۵/۴±۱/۲ ^d	۱۶/۷±۱/۲	nd	nd	۵۶/۸±۱/۲ ^{ab}	۵۸/۴±۱/۰ ^{ab}	۱۵/۹±۱/۱	۱۷/۳±۱/۰
۰/۶۵	۱۱/۷±۰/۸	۱۳/۱±۰/۷	۸/۷±۰/۱ ^d	۱۰/۰±۰/۶	۴۶/۶±۱/۲ ^{ab}	۴۹/۴±۱/۰ ^{ab}	۹/۰±۰/۳ ^d	۱۰/۳±۰/۲	nd	nd	۴۷/۵±۱/۱ ^{ab}	۵۰/۳±۱/۲ ^{ab}	۹/۵±۰/۲	۱۰/۹±۰/۷
۰/۷۵	۷/۵±۰/۷	۸/۷±۰/۵	۴/۸±۰/۱ ^d	۵/۹±۰/۲	۳۴/۸±۱/۲ ^{ab}	۳۷/۹±۱/۲ ^{ab}	۵/۰±۰/۲	۶/۰±۰/۳	nd	nd	۳۵/۶±۱/۰ ^{ab}	۳۸/۵±۱/۱ ^{ab}	۵/۴±۰/۱	۶/۵±۰/۴
۰/۸۵	۲/۲±۰/۴	۳/۳±۰/۶	.	.	۲۳/۸±۱/۱ ^{ab}	۲۶/۸±۱/۱ ^{ab}	۰/۳±۰/۱	.	nd	nd	۲۴/۴±۱/۲ ^{ab}	۲۷/۵±۱/۰ ^{ab}	.	۰/۵±۰/۱

a: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۱; b: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۲; c: کاهش معنی دار نسبت به شاهد ۱; d: کاهش معنی دار نسبت به محیط; A: غلظت حاد; C: غلظت مزمن.

ادامه جدول ۴-۱۲-۱۳ میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرارگیری در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

در صد همولیز گلبول قرمز

NaCl % ↓	DB(ah)A														B(ghi)Pe					
	→ آلاینده																			
	→ غلظت		F		A		C		F		A		C							
	→ زمان (ساعت)		۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴	۴	۲۴						
	↓ شاهد ۱	↓ شاهد ۲																		
۰	۱۰۰	۱۰۰	nd	nd	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	nd	nd	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰						
۰/۲	۹۴/۲±۲/۲	۹۶/۳±۲/۱	nd	nd	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۹۲/۳±۱/۱ ^d	۹۳/۹±۱/۱	nd	nd	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۹۲/۹±۱/۲	۹۴/۶±۱/۰						
۰/۳	۸۹/۴±۲/۳	۹۱/۵±۲/۴	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۷/۹±۱/۰	۸۹/۵±۱/۲	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۸/۴±۱/۱	۹۰/۰±۱/۱						
۰/۳۲۵	۸۳/۶±۱/۴	۸۵/۲±۲/۱	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۱/۸±۱/۲	۸۳/۵±۱/۱	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۸۲/۴±۱/۱	۸۴/۰±۱/۲						
۰/۳۵	۷۵/۷±۲/۲	۷۶/۵±۲/۳	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۳/۹±۱/۱	۷۴/۹±۱/۰	nd	nd	۱۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۷۴/۵±۱/۲	۷۵/۴±۱/۱						
۰/۳۷۵	۷۰/۸±۱/۳	۷۱/۶±۱/۵	nd	nd	۹۷/۴±۱/۲ ^{ab}	۹۹/۲±۰/۳ ^{ab}	۶۸/۹±۱/۰	۶۹/۸±۱/۲	nd	nd	۹۸/۵±۰/۸ ^{ab}	۱۰۰ ^{ab}	۶۹/۵±۱/۱	۷۰/۶±۱/۰						
۰/۴	۶۲/۲±۲/۲	۶۳/۲±۱/۹	nd	nd	۹۲/۳±۱/۱ ^{ab}	۹۴/۹±۱/۰ ^{ab}	۶۰/۹±۱/۱	۶۲/۴±۱/۰	nd	nd	۹۳/۴±۱/۰ ^{ab}	۹۵/۷±۱/۲ ^{ab}	۶۱/۴±۱/۲	۶۲/۹±۱/۱						
۰/۴۲۵	۵۶/۲±۲/۳	۵۷/۵±۱/۸	nd	nd	۸۸/۱±۱/۰ ^{ab}	۸۹/۹±۱/۰ ^{ab}	۵۴/۳±۱/۲	۵۶/۰±۱/۱	nd	nd	۸۹/۳±۱/۱ ^{ab}	۹۰/۴±۱/۲ ^{ab}	۵۴/۹±۱/۰	۵۶/۶±۱/۲						
۰/۴۵	۴۸/۴±۱/۲	۴۹/۳±۱/۴	nd	nd	۸۲/۵±۱/۱ ^{ab}	۸۴/۹±۱/۱ ^{ab}	۴۶/۵±۱/۱	۴۷/۶±۱/۰	nd	nd	۸۳/۴±۱/۲ ^{ab}	۸۵/۷±۱/۳ ^{ab}	۴۷/۰±۱/۲	۴۸/۳±۱/۱						
۰/۴۷۵	۴۰/۲±۱/۲	۴۱/۱±۱/۰	nd	nd	۷۷/۶±۱/۲ ^{ab}	۷۹/۳±۱/۲ ^{ab}	۳۸/۴±۱/۰	۳۹/۴±۱/۲	nd	nd	۷۸/۴±۱/۰ ^{ab}	۸۰/۲±۱/۱ ^{ab}	۳۸/۹±۱/۱	۴۰/۰±۱/۱						
۰/۵	۳۲/۳±۱/۱	۳۳/۱±۱/۳	nd	nd	۷۲/۸±۱/۲ ^{ab}	۷۳/۹±۱/۱ ^{ab}	۳۰/۵±۱/۱	۳۱/۵±۱/۰	nd	nd	۷۳/۶±۱/۱ ^{ab}	۷۴/۹±۱/۰ ^{ab}	۳۱/۱±۱/۲	۳۲/۲±۱/۲						
۰/۵۵	۲۲/۲±۱/۱	۲۴/۳±۱/۶	nd	nd	۶۴/۹±۱/۱ ^{ab}	۶۶/۶±۱/۳ ^{ab}	۲۱/۴±۱/۰	۲۲/۹±۱/۲	nd	nd	۶۵/۷±۱/۰ ^{ab}	۶۷/۱±۱/۲ ^{ab}	۲۱/۹±۱/۱	۲۳/۶±۱/۱						
۰/۶	۱۷/۱±۱/۳	۱۹/۴±۱/۷	nd	nd	۵۷/۶±۱/۰ ^{ab}	۵۹/۳±۱/۱ ^{ab}	۱۶/۴±۱/۰	۱۷/۹±۱/۱	nd	nd	۵۸/۴±۱/۱ ^{ab}	۶۰/۰±۱/۰ ^{ab}	۱۶/۸±۱/۱	۱۸/۶±۱/۲						
۰/۶۵	۱۱/۷±۰/۸	۱۳/۱±۰/۷	nd	nd	۴۸/۲±۱/۲ ^{ab}	۵۰/۹±۱/۰ ^{ab}	۹/۹±۰/۴	۱۱/۴±۰/۶	nd	nd	۴۹/۱±۱/۳ ^{ab}	۵۱/۶±۱/۴ ^{ab}	۱۰/۵±۰/۸	۱۲/۰±۱/۰						
۰/۷۵	۷/۵±۰/۷	۸/۷±۰/۵	nd	nd	۳۶/۳±۱/۱ ^{ab}	۳۹/۱±۱/۲ ^{ab}	۵/۸±۰/۳	۷/۰±۰/۲	nd	nd	۳۷/۴±۱/۰ ^{ab}	۳۹/۹±۱/۱ ^{ab}	۶/۴±۰/۵	۷/۶±۰/۸						
۰/۸۵	۲/۲±۰/۴	۳/۳±۰/۶	nd	nd	۲۵/۲±۱/۱ ^{ab}	۲۸/۰±۱/۱ ^{ab}	۰/۴±۰/۱	۰/۹±۰/۲	nd	nd	۲۶/۱±۱/۰ ^{ab}	۲۸/۸±۱/۲ ^{ab}	۰/۹±۰/۲	۱/۶±۰/۶						

a: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۱; b: افزایش معنی دار نسبت به شاهد ۲; c: کاهش معنی دار نسبت به شاهد ۱; d: کاهش معنی دار نسبت به محیط A: غلظت حاد; C: غلظت مزمن.

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات

۵- بحث و نتیجه گیری

خلیج فارس یکی از آلوده ترین اکوسیستم های دریایی در جهان محسوب می گردد. تقریباً دو سوم ذخایر نفت جهان در این منطقه قرار دارد (khan 2002). این منطقه در طول دهه های اخیر توسعه قابل توجهی یافته است. بر این اساس تعداد زیادی کارخانجات صنعتی، اسکله، پالایشگاه و سکوها های نفتی در این اکوسیستم دریایی و در کشورهای حاشیه آن توسعه یافته است که این مراکز به عنوان منبع عمده و اصلی آلودگی در این اکوسیستم محسوب می گردند (Tolosa et al., 2005). در این مطالعه سواحل استان خوزستان واقع در شمال غرب خلیج فارس انتخاب گردید. دلیل این انتخاب وجود منابع آلوده کننده مهم نظیر پالایشگاه، اسکله، بنادر و.... در این منطقه بود که منجر به ورود حجم زیادی از آلودگی به سواحل این منطقه گردیده است. از سوی دیگر به دلیل وجود زیستگاه های مهم برای آبزیان در طول این سواحل (نظیر خوریات)، این منطقه نقش مهمی در پرورش لارو و نوزاد بسیاری از آبزیان ایفا می کند، همچنین از صید گاه های آن سالانه مقادیر قابل توجهی از انواع آبزیان استحصال می گردد. لذا وجود این منابع آلوده کننده منجر شده تا موجودات آبی در سواحل این منطقه در معرض تهدید قرارگیری در معرض آلودگی هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای قرار گیرند. از بین انواع مختلف آبزیان، ماهی گل خورک به دلیل فراوانی و پراکنش بالا در سطح خلیج فارس و منطقه، زندگی در رسوبات و عدم توانایی تحرک و جابجایی زیاد به عنوان شاخص زیستی آلودگی هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای انتخاب گردید.

۵-۱ غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های زیستی (بافت کبد و آبشش)

میزان غلظت ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های زیستی (بافت کبد و آبشش) و غیر زیستی (رسوب و آب) سنجش گردید. مقادیر هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در کبد و آبشش ماهیان گل خورک مورد آنالیز قرار گرفتند به دلیل اینکه این اندام ها تمایل به تجمع این ترکیبات

آلاینده دارند (Marcovecchio *et al.*, 1993). کبد بزرگترین غده بدن است که از این حیث نسبت به سایر بافت ها متمایز می باشد. در کنار شریان خون کبدی، این بافت محل اصلی دریافت خون از دستگاه گوارش، پانکراس، طحال و غیره محسوب می گردد. این وضعیت باعث می گردد کبد به عنوان نخستین بافت جهت متابولیزه کردن مواد و همچنین دریافت مواد سمی محسوب گردد. این بافت توانایی تجزیه مواد سمی را نیز دارا می باشد. با این حال افزایش سطوح سمی منجر به بروز آسیب در این بافت می گردد. بنابر این کبد به عنوان یکی از مهمترین ارگان های سمیت زدایی بدن و ارگان هدف انواع مختلف آلاینده های خارجی محسوب می گردد. بافت آبشش در انواع گونه های آبزیان به ویژه ماهیان به دلیل تماس مستقیم با محیط بیرون نقش مهمی در دریافت، جذب، نگهداری و یا انتقال انواع آلاینده ها دارد.

غلظت مجموع ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) در نمونه های بافت کبد ماهی گل خورک صید شده در ایستگاه جعفری بیشترین میزان را نشان می دهد که ایستگاههای زنگی <اروند> سمایی < و بحرکان در رتبه های بعدی قرار دارند. در نمونه های بافت کبد بررسی الگوی پراکنش ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای بیانگر حضور میزان بالای ترکیبات با وزن مولکولی کم (ترکیباتی با ساختار سه و چهار حلقه ای) است. این اندام ها همچنین نشانگر مناسبی جهت قرارگیری مزمن موجود در معرض ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای می باشد. مشخص است که تجمع این ترکیبات در بافت های جانوران آبی صورت می گیرد و بنابراین ترکیبات سنجش شده در بافت های جانوران آبی می تواند منعکس کننده در معرض قرارگیری این موجودات در گذشته بوده است. کبد غالباً به عنوان عضو نشان دهنده مناسب آلودگی آب بوده است، چرا که غلظت آنها به میزان حضور آنها در محیط بستگی دارد. آبشش در انواع گونه های آبزیان به ویژه ماهیان به دلیل تماس مستقیم با محیط بیرون نقش مهمی در دریافت، جذب، نگهداری و یا انتقال انواع آلاینده ها دارد.

حضور ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای با وزن مولکولی کم در نمونه های بافت کبد ماهی، می تواند در نتیجه انتقال متابولیک ترکیبات با وزن مولکولی بالا در این بافت باشد (Meador *et al.*, 1995). به طور کلی ماهی می تواند در حدود ۹۹٪ از ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای را در خلال ۲۴ ساعت اول جذب به متابولیت تبدیل کند، علاوه بر این نیمه عمر زیستی ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در انواع مختلف ماهی به کم است (Meador *et al.*, 1995). این عوامل می تواند در تغییر الگوی پراکنش و همچنین میزان این ترکیبات در بافت های مختلف ماهی تاثیر گذار باشد (Perugini *et al.*, 2007). نتایج مربوط به روند الگوی پراکنش این

ترکیبات در بافت کبد ماهی گل خورک همچنین نشان می دهد که منشا عمده و اصلی آلودگی هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در این منطقه آلودگی نفتی است. روند مشابهی در رابطه با الگوی پراکنش این ترکیبات، در نتایج حاصل از بررسی بافت کبد ماهی *Epinephelus coioides* در جنوب خلیج فارس توسط Tolosa و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشخص گردید. الگوی پراکنش ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد برخی دیگر از انواع گونه های ماهیان در سایر اکوسیستم های دریایی در جدول ۵-۱-۱۴ نشان داده شده است.

جدول ۵-۱-۱۴ الگوی پراکنش ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد برخی از انواع گونه های ماهیان

منبع	منطقه	الگوی پراکنش	گونه ماهی
this study	Persian gulf, Iran	3>4>5 *	<i>B. dussumieri</i> (this study)
Perugini et al. 2007	Adriatic sea, Italy	3>4>5,6	<i>Scomber scomberus</i>
Perugini et al. 2007	Adriatic sea, Italy	4>3>5,6*	<i>Merluccius merluccicus</i>
Perugini et al. 2007	Adriatic sea, Italy	3>4>5,6	<i>Micromesistius poutassou</i>
Perugini et al. 2007	Adriatic sea, Italy	4>3>5,6*	<i>Mullus barbatus</i>

* تعداد حلقه ها

غلظت مجموع ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) در بافت کبد ماهی گل خورک بین $3/99 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ (ایستگاه بحرکان) تا $46/64 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ (ایستگاه جعفری) سنجش گردید. حضور آلودگی به موقعیت جغرافیایی منطقه بستگی دارد و ماهیانی که در نزدیکی مناطق صنعتی زندگی می کنند می توانند دارای آلودگی بیشتری باشد. Pickut و همکاران در سال ۲۰۰۲ پیشنهاد نمودند که ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای با وزن مولکولی مشابه دینامیک انتقال متفاوتی را در شرایط محیطی مختلف از خود نشان می دهند. این بدین معنی است که فاکتورهای زیادی در دسترس بودن زیستی این ترکیبات برای ماهی گل خورک در ایستگاههای مختلف تاثیرگذار هستند. وجود سایر عوامل استرس زا و تغییر در کیفیت غذا در کنار افزایش مصرف اکسیژن نیز می تواند بر روی میزان تجمع هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای تاثیرگذار باشد (Lemke and Kennedy, 1997).

به طور معمول، ترکیب B(a)py به عنوان شاخص کلی از تمامی ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در نظر گرفته می شود (Chimezie et al., 2005). کمیته سلامت مواد غذایی در سازمان FAO/WHO استاندارد هایی را در زمینه سلامت مواد غذایی در نظر گرفته است، براساس نظراین کمیته غلظت ترکیب B(a)py در نمونه های مختلف از حد مجاز 10 mg/kg نباید تجاوز کند

(Chimezie *et al.*, 2005). براین اساس غلظت ترکیب B(a)py در نمونه های بافت کبد ماهی گل خورک در سه ایستگاه اروند، جعفری و زنگی از استاندارد فوق الذکر تجاوز نکرده و بسیار پایین تر است. به نظر می رسد مکانیسم سمیت زدایی این ترکیبات (فاز اول و دوم متابولیسم آلاینده های آلی) در ماهی گل خورک دارای فعالیت و کارکرد بالا و موثری بوده است. در جدول ۵-۱-۱۵ میزان غلظت مجموع ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) در بافت کبد برخی از انواع گونه های ماهی نشان داده شده است.

جدول ۵-۱-۱۵ غلظت مجموع ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) در بافت کبد گونه های ماهی

منطقه	گونه ماهی (بافت کبد)	Total PAH	منبع
Persian gulf, Iran	<i>B. dussumieri</i> (this study)	3.99-46.64*	this study
Puget Sound, Washington	<i>Parophrys vetulus</i>	72 - 989*	Malins <i>et al.</i> 1994
Middle Atlantic Bight	Tilefish	21.96 - 12.8*	Steimle <i>et al.</i> 1990
NW Atlantic	<i>Gailus morhua</i>	nd - 585*	Hellou <i>et al.</i> 1993
Safaniya, Saudi Arabia	<i>Lethrinus nebulosus</i>	457 - 2920*	Fowler <i>et al.</i> 1993
Dubai, UAE, Persian gulf	<i>Epinephelus suillus</i>	117*	Fowler <i>et al.</i> 1993
Oman	<i>Epinephelus suillus</i>	12 - 32*	Fowler <i>et al.</i> 1993
Catalan Mediterranean Coast	<i>Thunnus thynnus</i>	80 - 270*	Porte & Albaiges, 1993

* واحد اندازه گیری ng/g d w

در نمونه های بافت آبشش ماهی گل خورک صید شده از ایستگاه های مختلف نمونه برداری پنج ترکیب هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای یافت گردید. بررسی الگوی پراکنش این ترکیبات در بافت آبشش نشان دهنده غالبیت ترکیبات با ساختار دو و سه حلقه ای در این بافت است. دلیل این روند الگوی پراکنش در بافت آبشش می تواند ناشی از این مسئله باشد که ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای نسبت به ترکیبات دارای حلالیت بیشتر در آب، به طور عادی و مستمر توسط سیستم آبشش ارگانسیم های آبی جذب نمی گردند، بلکه ترکیبات با حلالیت بالاتر در آب (K_{ow} پایین تر) به میزان بیشتری در دسترس زیستی ارگانسیم های آبی قرار دارند و بنابراین توسط بافت هایی نظیر آبشش راحت تر جذب می شوند. به طور کلی ترکیبات با وزن مولکولی کم نسبت به ترکیبات با وزن بالا به میزان بیشتری در ارگانسیم های دریایی یافت می شوند (Bumard, 1998).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه برای غلظت مجموع ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) در بافت های کبد و آبشش ماهیان گل خورک نشان می دهد که میانگین غلظت این ترکیبات در بافت کبد نسبت به بافت آبشش اختلاف معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.05$). اختلاف در میانگین غلظت ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت های مختلف، احتمالاً می تواند ناشی از تفاوت در عملکرد فیزیولوژیک و متابولیسم سلولی هر یک از بافت ها باشد (Kalay et al., 1999).

ماهی گل خورک از ماهیان همه چیزخوار می باشد (Polgar, 2010)، که در مقایسه با ماهیان فیلتر فیدر، بافت آبشش دارای فعالیت متابولیکی پایین تری نسبت به بافتهای دیگر می باشد و این امر در کنار در دسترس بودن کمتر ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای احتمالاً می تواند دلیلی بر میزان تجمع زیستی پایین در این بافت باشد. آلاینده های آلی اندام هدف خود را براساس میزان فعالیت متابولیک و میزان چربی آن بافت انتخاب می کنند (Perugini et al., 2007). این نکته، علت تجمع بیشتر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد ماهی گل خورک را در مقایسه با بافت آبشش تفسیر می نماید.

بافت آبشش در تماس مستقیم با محیط آبی قرار دارد و احتمالاً حضور ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در آبشش ماهی به سرعت توسط جریان چرخشی خون پاک شده و به دیگر نقاط بدن نظیر کبد (مکانی که می تواند به مدت طولانی تری باقی بماند) انتقال می یابد (Perugini et al., 2007).

در کبد همچنین حضور هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای احتمالاً با فعالیت متابولسمی این بافت در کنار فاکتورهای دیگری نظیر پراکنش و حضور آنزیم های مخصوص و مکانیسم های سمیت زدایی که منجر به بروز آسیب های فیزیولوژیک می گردد، مرتبط است (Rudneva et al., 2010).

ماهی گل خورک تغذیه همه چیزخواری دارد و آبشش ماهی دارای فعالیت متابولیسم پایین است، با توجه به اینکه این موارد می توانند نقش مهم و تعیین کننده ای در تجمع زیستی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای داشته باشد، به نظر می رسد آبشش در ماهی گل خورک نقش زیادی در جذب این ترکیبات ندارد.

تفاوت در تجمع زیستی آلاینده های آلی در بافت های مختلف می تواند ناشی از وضعیت فیزیولوژیک بافت، حضور آنزیم ها در جهت جذب و یا نقش آن بافت در مکانیسم سمیت زدایی باشد (Rudneva et al., 2010).

کبد به عنوان محل سمیت زدایی و برداشت مواد سمی که در خون جریان دارند محسوب می گردد (Rudneva et al., 2010). به علاوه کبد ارگان اصلی در جهت فعالیت های متابولیک نظیر سمیت زدایی

محسوب می گردد، بنابراین ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می تواند از سایر بافت ها نظیر آبشش به این بافت منتقل گردد.

به طور کلی جذب آلاینده ها از طرق آب، غذا و رسوبات (ارگانسم های کف خوار و نقب زن) صورت می گیرد. با این حال کارایی جذب از آب و یا غذا در رابطه با نیاز های اکولوژیک، متابولیسم و گرادیان آلودگی در آب، غذا و رسوب به همراه فاکتورهایی نظیر شوری، درجه حرارت و... تفاوت دارد. به نظر می رسد پایین بودن میزان تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت آبشش می تواند ناشی از کارایی کمتر این بافت در ماهی گل خورک در جذب این ترکیبات باشد.

۵-۲ غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های غیر زیستی (رسوب و آب)

میزان غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه رسوب تغییرات گسترده ای را نشان می دهد. غلظت مجموع این ترکیبات در نمونه های رسوب در ایستگاه جعفری بیشترین میزان را نشان می دهد که ایستگاههای زنگی < اروند > سمایلی < و بحرکان در رتبه های بعدی از این حیث قرار دارند. همان طور که در بخش ۵-۱ ذکر گردید روند مشابهی در بافت کبد نیز مشخص گردید. نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه برای غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) اختلاف معنی داری بین ایستگاههای مختلف نشان می دهد ($p < 0.05$).

میزان غلظت ترکیبات شانزده گانه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای سنجش شده در این مطالعه در نمونه های زیستی و غیر زیستی الگوی متفاوتی را نشان می دهد. به نظر می رسد که هر کدام از ترکیبات یافت شده نشان دهنده پساب ویژه ای است که به درون اکوسیستم وارد می شود. (درواقع هر کدام از پساب ها دارای ویژگی ها و نوع آلاینده خاصی هستند).

ایستگاه های جعفری، زنگی و سمایلی در خور موسی واقع شده اند. خور موسی یک محیط بسته با چرخش آب محدود است. متأسفانه اکثر کارخانجات و صنایع پتروشیمی، اسکله و بنادر پساب خود را بدون انجام تیمار و تصفیه خاصی به درون این خور رهاسازی می کنند. وجود منطقه ویژه اقتصادی و پتروشیمی ماهشهر در حاشیه این خور به عنوان یکی از مراکز و پالایشگاههای مهم و اصلی ایران در بحث تولیدات نفتی منجر به افزایش ورود بیش از پیش آلودگی نفتی به ویژه ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به درون خور موسی گردیده است. به همین دلیل میزان غلظت بالاتری از این ترکیبات در ایستگاههای جعفری، زنگی و سمایلی (واقع شده در خور موسی) بیشتر از سایر ایستگاهها مورد انتظار است. با این وجود میزان غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاه اروند بیشتر

از سمایی ثبت گردید. به نظر می رسد وجود رودخانه اروند به عنوان پر آب ترین رود ورودی به خلیج فارس منجر به ورود میزان زیادی از مواد آلی از خشکی در کنار حجم بالایی از پساب پالایشگاه آبادان به دهانه اروندرود در خلیج فارس می گردد که این مسئله موجب گردیده تا میزان غلظت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاه اروند بیشتر شود.

کمترین میزان غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مربوط به ایستگاه بحرکان ($113/05 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) و بیشترین میزان مربوط به ایستگاه جعفری ($3384/34 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) مشخص گردید. با این حال مقادیر سنجش شده از میزان استاندارد کیفی رسوب که توسط سازمان NOAA ($4022 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) ارائه گردیده است کمتر است. این مسئله نشان دهنده کمتر بودن میزان آلودگی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از استاندارد های جهانی نظیر NOAA در ایستگاه های نمونه برداری واقع شده در رسوبات سواحل شمال غرب خلیج فارس است. Tolosa و همکاران در سال ۲۰۰۵ نتایج مشابهی نسبت به این مطالعه در نمونه های رسوب سواحل جنوب خلیج فارس (بحرین، قطر، عمان و امارات) را بیان نمودند. در جدول ۵-۲-۱۶ مجموع غلظت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مربوط به نمونه های رسوب در سایر اکوسیستم های دریایی جهان نشان داده شده است.

جدول ۵-۲-۱۶ مجموع غلظت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب برخی

اکوسیستم های دریایی

منبع	میزان ($\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$)	اکوسیستم
This study	113.50-3384.34	Persian gulf
Eghtesadi et al. 2002	24-1374	Northern Persian Gulf
Hu et al. 2009a	97.2-204.8	Laizhou Bay, China
Anderson et al. 1996	80-20,000	San Diego Bay, USA
Kim GB et al. 1999	9.1-1400	Masan Bay, Korea
Ningjing et al. 2010	144.5-291.7	Liaodong Bay, China
Yan et al. 2009	42.5-158.2	Daya Bay, China
Pereira et al. 1996	2636-27510	San Francisco Bay, USA
Hu et al. 2009b	140.6-300.7	Bohai Bay, China

نتایج الگوی پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بیانگر غالبیت ترکیبات با ساختار سه و چهار حلقه ای در نمونه های رسوب است. تفاوت در این روند می تواند نشان دهنده و مرتبط با منابع مختلف ورودی این ترکیبات به درون رسوبات است. غلظت ترکیب B(a)A در نمونه های رسوب بیشترین میزان فراوانی و غلظت را نشان می دهد. حضور بالای ترکیبات با ساختار حلقه ای کم تراکم (با تعداد حلقه های کم) نشان دهنده منشا آلودگی نفتی در رسوبات این منطقه است (Sericano *et al.*, 2001). میزان سمیت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای همانند سایر مواد شیمیایی به میزان در دسترس بودن زیستی آنها بستگی دارد. آلاینده های با وزن مولکولی بالا به دلیل کمتر بودن میزان در دسترس بودن زیستی دارای سمیت پایین تری هستند (Perugini *et al.*, 2007). بر این اساس حضور ترکیبات با وزن مولکولی کمتر در این منطقه می تواند منجر به افزایش میزان سمیت آن ها برای ارگانیسم ها و موجودات ساحلی و دریایی گردد.

میزان ریسک و خطر اکولوژیک ترکیبات مختلف هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب ایستگاه های مختلف نمونه برداری با استفاده راهنمای تاثیرگذاری میزان غلظت این ترکیبات که توسط Long و همکاران در سال ۱۹۹۵ و Ningjing و همکاران در سال ۲۰۱۰ پیشنهاد گردیده، بررسی می گردد به طور کلی اگر غلظت ترکیبات مختلف هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای کمتر از دامنه پایین تاثیر گذاری (${}^{\text{ERL}}$ ^۳) باشد، نشان دهنده احتمال تاثیرگذاری اکولوژیک کمتر از ۱۰٪ این ترکیبات است. این در حالی است که اگر میزان غلظت ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای بالاتر از دامنه متوسط تاثیر گذاری (${}^{\text{ERM}}$ ^۳) باشد، بیانگر تاثیرگذاری اکولوژیک بیشتر از ۵۰٪ این ترکیبات است (Long *et al.*, Ningjing *et al.*, 2010; 1995). در این مطالعه غلظت ترکیبات B(a)A, F, AC, Ph, Ch, در هشت مورد بالاتر از استاندارد ERL ولی پایین تر از استاندارد ERM بود. در جدول ۵-۲-۱۷ ریسک اکولوژیک ترکیبات آنالیز شده در نمونه های رسوب ایستگاههای مختلف نمونه برداری با میزان استاندارد ERL و ERM مقایسه شده است. این نتایج نشان می دهد که ریسک اکولوژیک منفی ناشی از این ترکیبات در منطقه نمونه برداری (سواحل خوزستان) است. اما غلظت دیگر ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای پایین تر از استاندارد ERL است که نشان دهنده تاثیر اکولوژیک نسبتا پایین این ترکیبات است.

در نمونه های آب فقط هشت ترکیب هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای سنجش گردید. نتایج همچنین نشان دهنده غالبیت ترکیبات با ساختار دو و سه حلقه ای در نمونه های آب است. حضور ترکیبات

^۱effect range-low

^۲effect range-median

با ساختار حلقه ای پر تراکم (با تعداد حلقه های زیاد) می تواند به دلیل حلالیت پایین این ترکیبات در آب (میزان حلالیت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در آب با افزایش تعداد حلقه ها و وزن مولکولی کاهش می یابد) و همچنین جذب آنها توسط ذرات معلق درون آب باشد که منجر به ته نشین شدن آنها به درون رسوبات می گردد. نتایج مشابهی در زمینه حضور ترکیبات با ساختار دو و سه حلقه ای در نمونه های آب در آبهای اطراف انگلیس یافت گردید (Law et al., 1997).

جدول ۵-۲-۱۷ ریسک اکولوژیک ترکیبات آنالیز شده در نمونه های رسوب در مقایسه با میزان استاندارد ERL و ERM

PAHs	Guidelines		ایستگاه نمونه برداری				
	ERL	ERM	اروند	جعفری	زنگی	سمایی	بحرکان
B(a)A	261	1600	ERL<...< ERM	ERL<...< ERM	ERL<...< ERM	< ERL	< ERL
F	19	540	ERL<...< ERM	< ERL	< ERL	< ERL	< ERL
AC	44	640	<ERL	ERL<...< ERM	ERL<...< ERM	< ERL	nd
Ph	24	1500	< ERL	ERL<...< ERM	< ERL	< ERL	< ERL
Ch	384	2800	< ERL	ERL<...< ERM	< ERL	< ERL	< ERL
B(a)Py	430	1600	< ERL	< ERL	< ERL	nd	nd
Fl	600	5100	< ERL	< ERL	< ERL	< ERL	< ERL
Py	665	2600	< ERL	< ERL	< ERL	< ERL	< ERL
TPAHs	4022	44792	< ERL	< ERL	< ERL	< ERL	< ERL

nd: non detected;

۵-۳ منبع آلودگی

با پیشرفت دانش ژئوشیمی جهت شناسایی منشا ورودی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با توجه به پروسه هایی که توسط آنها ایجاد می شوند، شاخص های مولکولی بر اساس ویژگی پایداری ترمودینامیکی این ترکیبات توسعه پیدا کرده اند (Zulgari et al., 2009). با این حال به دلیل پیچیدگی پارامترهایی که در پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در محیط زیست نقش دارند، استفاده از مجموعه ای از شاخص های مولکولی ضروری است.

بررسی نسبت Fl/py برای نمونه های رسوب و بافت کبد ماهی گل خورک نشان دهنده منشا پتروژنیک آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاههای اروند، زنگی، سمایلی و بحرکان است. با این وجود بررسی این نسبت بیانگر منشا پیرولیتیک آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاه جعفری است. در مورد نمونه های آب و آبشش اعداد مربوط به نسبت Fl/py نشان دهنده منشا پیرولیتیک آلودگی به جز در ایستگاه بحرکان است.

نسبت Ch/B(a)A بیانگر منشا پتروژنیک در نمونه های رسوب و بافت کبد ایستگاههای اروند، زنگی، سمایلی، بحرکان و جعفری است. این نسبت در مورد نمونه های آب بیانگر منشا پیرولیتیک در ایستگاههای جعفری و اروند و منشا پتروژنیک در ایستگاه زنگی است. علاوه بر این، بررسی الگوی پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بیانگر حضور ترکیبات با وزن مولکولی کم در نمونه های مختلف آب، رسوب و بافت ماهی است، حضور ترکیبات با وزن مولکولی کم موکد آلودگی با منشا نفتی است. نکته قابل ذکر حاصل از نتایج استفاده از نسبت های مختلف در این بررسی این است پارامترهای زیاد و پیچیده ای در پراکنش هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاه های مختلف نمونه برداری تاثیرگذار بوده اند، که این مسئله لزوم استفاده از مجموعه ای از نسبت های فوق الذکر را در زمان بررسی و تعیین منشا آلودگی بیش از پیش مهم می سازد.

۴-۴ شاخص های بیولوژیک

شاخص HSI بررسی شده در این مطالعه نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین ایستگاههای مختلف نمونه برداری وجود دارد. رابطه معنی دار قوی ($p < 0.01$ و $r = 0.534$) بین شاخص HSI و غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد یافت گردید. شاخص های بیولوژیک به میزان زیادی جهت ارزیابی وضعیت کلی ماهی در مطالعات تاکسیکولوژیک محیطی مورد استفاده قرار می گیرد. این شاخص ها دارای پتانسیل بالایی در نشان دادن اثرات سمیت هستند، همچنین اطلاعات مفیدی در

مورد ذخیره انرژی و توانایی موجود نسبت به تحمل آلودگی و یا دیگر استرس های محیطی را نشان می دهد (Yilmaz et al., 2006). به طور کلی افزایش اندازه کبد می تواند در نتیجه افزایش پروسه های جبرانی برای دفع و یا کاهش خطرات عوامل آلاینده باشد، اما این افزایش سایز بیماری محسوب نمی گردد بلکه می تواند نشانه ای از ورود آلودگی و تاثیر گذاری آن بر بدن موجود باشد (William and Iatropoulos, 2002). بررسی نتایج نشان می دهد که تجمع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بر بافت کبد ماهی گل خورک به عنوان مقصد نهایی عوامل آلاینده در بدن ماهی گل خورک تاثیر گذار بوده است. در مطالعات Van der oost و همکاران در سال ۲۰۰۳ نتایج مشابهی با این بررسی مشخص گردید.

اختلاف معنی داری مربوط به شاخص CF بین ایستگاههای مختلف نمونه برداری یافت نگردید. شاخص CF بیانگر وضعیت فیزیولوژیک ماهی در زمینه سلامت بدن است که دسترسی به غذا و فاکتور های محیطی از فاکتور های مهم و تاثیر گذار بر روی این شاخص محسوب می گردند. به نظر می رسد بین ایستگاه های مختلف نمونه برداری از لحاظ فاکتور های فوق الذکر به ویژه میزان دسترسی ماهی گل خورک به غذا تفاوتی وجود ندارد.

۵-۵ پاسخ های فیزیولوژیک ماهی گل خورک به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

در این مطالعه ترکیبی از بیومارکرهای اختصاصی و غیراختصاصی جهت ارزیابی پاسخ فیزیولوژیک ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* به عنوان شاخص زیستی آلودگی و همچنین پایش وضعیت زیست محیطی شمال غرب خلیج فارس (سواحل خوزستان) از لحاظ آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای استفاده شده است. علاوه بر آن رابطه بین بیومارکرها (آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز، تغییرات غشاء لیزوزوم و پایداری غشاء گلبول قرمز) و غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای جهت ارزیابی اهمیت و کاربرد بیومارکرهای مورد استفاده در پایش زیستی آلودگی این ترکیبات مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.

۵-۵-۱ فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز

نتایج نشان دهنده میزان فعالیت های بالای آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در بافت کبد ماهی گل خورک در ایستگاه جعفری است که ایستگاه زنگی < ارونند > سمایی < و بحرکان در رتبه های بعدی قرار دارند. این در حالی است که میزان فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در بافت کبد ماهی گل خورک فقط بین ایستگاه های جعفری و بحرکان اختلاف معنی داری را نشان می دهد. رابطه معنی داری ($p < 0.01$) بین

غلظت مجموع ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای ($\Sigma 16\text{PAH}$) در بافت کبد و نمونه های رسوب با میزان فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در بافت کبد ماهی گل خورک یافت گردید.

این میزان فعالیت آنزیم نشان می دهد که ماهی گل خورک در ایستگاههای نمونه برداری در سواحل خوزستان ممکن است در معرض آلاینده های موثر بر تحریک بیوستز این آنزیم نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای قرار دارد.

انتقال زیستی ترکیبات هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای در خلال فاز ۱ و فاز ۲ برای سمیت زدایی و دفع این آلاینده مهم و ضروری است. به نظر می رسد فعالیت بالای آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در کنار وجود رابطه معنی دار قوی با میزان آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب و بافت کبد ماهی گل خورک نشان دهنده نقش مهم این آنزیم در ماهی گل خورک در کاتالاز واکنش کونژوگه شدن تری پتید گلوکوتایون به متابولیت های حاصل از فاز اول متابولیسم این آلاینده است، که ترکیبات مختلف ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را برای دفع آماده می کند.

وجود رابطه معنی دار بین بیوستز آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز و تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد می تواند ناشی از وجود ارگان هایی با کارایی گسترده در زمان در معرض قرار گیری است و پس از آن سیستم های ترمیمی عمل می کنند، بنابر این وجود یک مکانیسم حفاظتی یکی از سودمند ترین فواید در طول مدت زمان در معرض قرارگیری محسوب می گردد. (Havelková et al., 2008b). به نظر می رسد در بافت کبد ماهی گل خورک یک مکانیسم حفاظتی مناسب جهت جلوگیری از بروز سمیت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در این گونه وجود دارد.

به نظر می رسد آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در کبد ماهی گل خورک نقش کلیدی در سمیت زدایی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ماهی گل خورک ایفا می کند و می تواند ابزار مناسبی در ارزیابی اثرات سمی این ترکیبات در این گونه و همچنین در ارزیابی انتقال زیستی این ترکیبات به سطوح بالاتر محسوب گردد.

افزایش میزان هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می تواند منجر به افزایش فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز گردد (Havelková et al., 2008b; Sen and Kirikbakan, 2004). نتایج به دست آمده در این بررسی نیز نشان می دهد که بیوستز آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در ماهی گل خورک مورد مطالعه به میزان زیادی توسط ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای تحت تاثیر قرار گرفته است.

محققان بسیاری وجود یک رابطه قوی بین تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و محتوای گلوکوتایون اس ترانسفراز در بافت های ماهی به عنوان آنزیم موثر در متابولیسم سمیت زدایی را نشان داده اند (Ahmad *et al.*, 2004; Havelkova *et al.*, 2008a; Henson *et al.* 2001; Van der Oost *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2003).

در غلظت های بالا، آلاینده ها به میزان زیادی تجمع یافته و سمیت رخ می دهد که این مسئله منجر می گردد که رابطه معنی دار قوی بین تجمع زیستی آلاینده و بیوسنتز آنزیم از بین رود (Ahmad *et al.*, 2004). به نظر می رسد در این بررسی میزان تجمع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از ظرفیت متابولیسم این ترکیبات در بافت کبد ماهی گل خورک فراتر نرفته است.

حساسیت گونه های مختلف ماهی و فعالیت آنزیمی نسبت به متابولیسم هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می تواند متفاوت باشد (Vander oost *et al.*, 2003; Haveelkova *et al.*, 2008b). نتایج این بررسی نشان می دهد که بروز و فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز به عنوان فاز دوم متابولیسم سمیت زدایی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ماهی گل خورک دارای حساسیت بالایی است.

آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز به همراه گلوکوتایون به عنوان سیستم های اصلی و غالب درون سلولی جهت حفاظت سلول در برابر استرس اکسیداتیو نقش ایفا می کنند. بسیاری از آلاینده ها نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به عنوان استرس های اکسیداتیو عمل می کنند و آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز را به عنوان بستر خود انتخاب می کنند (Sen and Kirikbakan, 2004). به نظر می رسد حضور استرس های اکسیداتیو نظیر ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بروز و فعالیت بالای آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* موثر بوده است.

میزان بالای فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در بافت کبد همچنین می تواند ناشی از نیازهای اکولوژیک، فعالیت های متابولیکی، نرخ بالای متابولیک و مصرف اکسیژن و نقش بافت کبد در پروسه های سمیت زدایی عوامل آلاینده به ویژه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ماهی گل خورک به عنوان یک ماهی دوزیست باشد.

کبد به طور ویژه یکی از مکان های اولیه تولید آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز محسوب می گردد (Bard, 2000). سطوح بالای فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در بافت با سطوح بالای mRNA رابطه مستقیمی دارد (Whyatt *et al.*, 2000). بروز ژن گلوکوتایون اس ترانسفراز نشانگر مناسبی از

قرارگیری موجود در معرض آلاینده محسوب می گردد. به نظر می رسد افزایش فعالیت این آنزیم در بافت کبد ماهی گل خورک با سطوح بالای GST mRNA در این بافت رابطه داشته باشد.

۵-۵-۲ میزان تغییرات غشا لیزوزوم (تست NRR time)

در این مطالعه میزان تغییرات غشاء لیزوزوم سلول خونی ماهی گل خورک در ایستگاه های مختلف نمونه برداری در سواحل شمال غرب خلیج فارس جهت ارزیابی و امکان سنجی استفاده از این تست به عنوان بیومارکر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و همچنین در جهت ارزیابی وضعیت آلودگی این مناطق مورد استفاده قرار گرفته است.

نتایج نشان می دهد که میزان NRR time در ایستگاه جعفری بیشترین میزان را دارد که ایستگاههای زنگی < ارونند > سمایلی < و بحرکان از این حیث در رتبه های بعدی قراردارند. رابطه معنی داری بین غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بافت کبد و رسوبات با میزان NRR time مربوط به لیزوزوم سلول خون ماهی گل خورک یافت گردید.

تست NRR time میزان خروجی محتوای لیزوزوم را به درون سلول مشخص می کند که به عنوان یک تست سریع و حساس در ارزیابی تغییر در پروسه های فیزیولوژیک ناشی از عوامل آلاینده موثر است. در واقع اساس این تست بر مبنای این تئوری است که تنها لیزوزوم های سلول های سالم قادر به جذب و نگهداری رنگ NR هستند.

در این بررسی میزان تغییرات پایداری غشا لیزوزوم در سلول های خونی ماهی گل خورک با استفاده از تست NRR time ارزیابی شده است. آزمایشات دقیق بر روی غشا لیزوزوم توسط تکنیک های آزمایشگاهی در سلول های خونی به عنوان یکی از انواع سلول هایی که غنی از لیزوزوم هستند در ارزیابی اثرات ناشی از عوامل آلاینده در اکوسیستم های دریایی کمک بسزایی می نمایند (Catsiki et al., 2001; Lowe et al., 1995).

میانگین NRR time نمونه های خون ماهی گل خورک در تمامی ایستگاه های نمونه برداری پایین تر از ۹۰ دقیقه بود. مدت زمان جمع آوری نمونه ها در کنار مدت زمان ماندگاری ماهی در آزمایشگاه می تواند بر روی میزان زمان NRR time تاثیر گذار باشد (Dailianis et al., 2003). در این مطالعه، صید نمونه های ماهی در کوتاه ترین زمان ممکن و با کمترین استرس صورت گرفته است و همچنین نمونه ها بلافاصله پس از صید به آزمایشگاه منتقل و تست NRR time صورت گرفته است. همچنین پایین بودن میزان NRR time می تواند به ویژگی های گونه، نیازهای فیزیولوژیک گونه و سطوح آلودگی

در ایستگاه های مختلف نمونه برداری مرتبط باشد. Fernely و همکاران در سال ۲۰۰۰ نتایج مشابهی با این بررسی دست یافتند.

نتایج این بررسی نشان می دهد که ورود و یا تجمع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و یا متابولیت آنها به درون سلول بر روی میزان پایداری غشاء لیزوزوم این سلول های ماهی گل خورک تاثیرگذار بوده است. لیزوزوم به عنوان مقصد نهایی اثرسمیت عوامل آلاینده درون سلول مطرح است، چرا که این اندامک نقش مهمی در بسیاری از پروسه های سلولی از جمله سمیت زدایی ترکیبات از سیتوزول را ایفا می کند (Stefanoni and Abessa, 2008).

Cheung و همکاران در سال ۱۹۹۸ در بررسی تغییرات غشا لیزوزوم به عنوان بیومارکر آلودگی نفتی به نتایج مشابهی نسبت به این بررسی دست پیدا کردند.

Martins و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز رابطه مستقیمی و معنا داری بین میزان تغییرات غشا لیزوزوم و آلودگی نفتی در بافت و رسوبات دست پیدا کردند.

لیزوزوم به عنوان یک اندامک درون سلولی که توسط غشاء احاطه شده است دارای آنزیم های هیدرولیتیک است که در تجزیه مواد درون سلول و یا موادی که از خارج سلول جذب می شوند (نظیر آلاینده ها) نقش ایفا می کند (D.W.T, 2004). براین اساس لیزوزوم توانایی جذب آلاینده های آلی نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را دارد. تغییر در آنزیم ها می تواند بر پایداری و یکپارچگی غشاء لیزوزوم تاثیر گذار باشد.

از سوی دیگر تغییر بر میزان پایداری و قوام غشاء لیزوزوم می تواند بر عملکرد پمپ های یونی لیزوزوم و همچنین میزان حجم لیزوزوم تاثیر گذار باشد. به نظر می رسد غلظت های مختلف آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاه های مختلف نمونه برداری بر روی عملکرد پمپ های یونی غشا لیزوزوم سلول خونی ماهی گل خورک تاثیر گذار بوده اند.

میزان پایداری غشا لیزوزوم در گونه های مختلف آبزیان نسبت به عوامل آلاینده مختلف متفاوت است، این مسئله لزوم مطالعه تاثیر عوامل آلاینده مختلف در گونه های مختلف آبزیان (به ویژه گونه هایی که به عنوان شاخص زیستی مورد استفاده قرار می گیرند) را بیش از پیش مهم و ضروری می سازد. نتایج این بررسی موکد این نکته است که استفاده از این بیومارکر (تست پایداری غشا لیزوزوم) با توجه به حساسیت ودقت بالا می تواند تاثیرات آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را بر روی ماهی گل خورک گونه

B. dussumieri پیش از آنکه بر روی سایر پروسه های حیاتی سلول و ارگانیزم در سطح بالاتر اثرگذار باشند را نشان دهد.

یکی از عوامل تاثیر گذار بر میزان پایداری غشا لیزوزوم تغییر در فاکتور های محیطی نظیر درجه حرارت و شوری است (Dailianis *et al.*, 2003). در این بررسی فاکتورهایی نظیر درجه حرارت و شوری در ایستگاههای مختلف نمونه برداری تفاوتی را نشان نمی دهد (درجه حرارت $25/2 \pm 0/7^{\circ}\text{C}$ و شوری ۳۸ گرم بر لیتر)

۳-۵-۵ تست پایداری غشاء سلول گلبول قرمز خون

مطالعات مربوط به فاکتور های خونی صورت گرفته در پایش زیستی عوامل آلاینده اکثرا بر روی میزان هماتوکریت، تغییر در تعداد سلول های خونی و یا تغییر در فاکتورهای بیوشیمیایی خون متمرکز بوده است، اما این فاکتورها اطلاعات کامل و جامعی در زمینه تاثیر آلودگی بر موجودات ارائه نمی دهند، چرا که عوامل متعددی در کنار آلاینده ها می توانند بر روی فاکتور های ذکر شده اثرگذار باشند. با این حال مطالعه مکانیسم سلولی بروز سمیت، اختصاصیت نسبت به انواع آلاینده ها و رابطه بین غلظت آلاینده ها و پاسخ به آنها در سلول های گلبول قرمز خون ابزار موثرتری در پایش زیستی آلودگی ارائه می دهد. علاوه بر این، سلول های گلبول قرمز خون به دلیل در دسترس بودن و سادگی جهت جداسازی به عنوان مدل مناسبی جهت مطالعه سمیت سلولی مورد استفاده قرار می گیرد.

نتایج نشان دهنده افزایش معنی دار میزان همولیز گلبول قرمز خون ماهی گل خورک همراه با افزایش غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای است. رابطه معنی داری بین مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های بافت کبد و رسوبات با میزان پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک یافت گردید.

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از طرق مختلف نظیر تغییر در ساختار و همچنین عملکرد غشاء سیتوپلاسمی در نهایت می توانند بر روی میزان قوام و پایداری غشاء تاثیرگذار باشند (Sikkema *et al.*, 1995).

آلاینده های چربی دوست به دلیل اندرکنش غیراختصاصی با چربی های غشاء منجر به افزایش جریان فعال پتاسیم از خلال غشاء سلول گلبول قرمز می گردند. این ترکیبات همچنین می توانند بر روی انتقال آنیون ها از خلال غشاء نیز تاثیرگذار بوده و میزان ورود و خروج نرمال آنها را تغییر می دهند. علاوه بر این، این

ترکیبات به نوبه خود منجر به کاهش جریان و انتشار فسفات از خلال غشا نیز می گردد (Bekatas and Ayik, 2010). ورود هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به درون سلول توسط پروسه غیرفعال انتشار می یابد. یکی از مکانیسم های مهم ورود این ترکیبات به درون سلول قرارگیری آنها به درون لایه چربی غشاء سیتوپلاسمی است. قرارگیری ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در بین چربی های غشاء سیتوپلاسمی (در بین زنجیره های فسفولیپید) می تواند منجر به به هم ریختن ساختار غشاء گردد (Sikkema *et al.*, 1995). مجموعه این عوامل در کنار یکدیگر می تواند در نهایت منجر به تغییر در عملکرد و کارکرد غشاء سلول گردد.

به نظر می رسد ورود ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به خون ماهی گل خورک و یا تولید فاکتور های همولیتیک توسط آنها از طریق تاثیر برروی عملکرد و ساختار غشاء سلول منجر به بروز تغییر در نفوذ پذیری (قابلیت تراوایی) و در نهایت برروی میزان تردی و قوام و پایداری غشاء سلول گلبول قرمز خون ماهی گردیده است. تاکنون مطالعات کمی در زمینه استفاده از تست میزان پایداری غشاء گلبول قرمز خون ماهی به عنوان بیومارکر در ارزیابی و پایش زیستی اثرات آلودگی به ویژه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در انواع مختلف گونه های ماهی صورت گرفته است. اکثر مطالعات در این زمینه به بررسی اثرات آلودگی بر روی میکروارگانیزم ها محدود شده است (Bekatas and Ayik, 2010; Sikkema *et al.*, 1995).

نتایج نشان دهنده وجود منحنی سیگموئید شکل در تست میزان پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک است. این شکل از منحنی در سایر مطالعات مربوط به نمونه های خون سایر گونه های ماهی نیز یافت گردیده است (Bekatas and Ayik, 2010; Seibert *et al.*, 2001).

۵-۵-۴ قرار گیری گلبول قرمز خون ماهی در معرض ترکیبات مختلف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در شرایط آزمایشگاهی

تاثیر آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای بر محیط زیست وجانداران مشخص و واضح است. با این حال مکانیسم سمیت این ترکیبات به میزان کمی مورد مطالعه قرار گرفته است. اطلاعات موجود نشان می دهد که این ترکیبات به دلیل دارا بودن خاصیت چربی دوستی با قسمت های چربی دوست سلول واکنش نشان می دهند که این واکنش نقش مهمی در مکانیسم سمیت این ترکیبات ایفا می کند. غشاء سلول به عنوان یکی از قسمت های چربی دوست سلول محسوب می گردد، از این رو ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای تمایل بالایی در تجمع در این بخش از سلول دارا می باشند. از سوی دیگر

قرار گیری ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در معرض و مسیر متابولیسم سمیت زدایی نیازمند عبور آنها از خلال غشاء سیتوپلاسمی و ورود آنها به درون سلول است. به طور کلی تجمع ترکیبات چربی دوست درون غشاء دو لایه چربی منجر به افزایش میزان دسترسی سلول به آنها می گردد اما به همین نسبت می تواند منجر به بروز اثرات سمی نیز گردد. بنابراین مطالعه مکانیسم و نحوه سمیت ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در غشاء سلول های زیستی کمک شایانی در کسب اطلاعات پیرامون مکانیسم کلی بروز سمیت درون موجودات ایفا می کند. در بین انواع سلول ها، گلبول قرمز خون می تواند مدل مناسبی برای مطالعه مکانیسم سمیت سلولی در آبزیان به ویژه ماهی محسوب گردد. مطالعات بسیاری در سطح آزمایشگاهی بر روی مکانیسم ایجاد سمیت در غشاء سلول میکروارگانیسم ها و همچنین سیستم غشاء بافری ناشی از هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای صورت گرفته است (Rodrigues *et al.*, 2011; Mackay *et al.*, 1991; Barakat *et al.*, 2005; Sikkema *et al.*, 1995). اما تاکنون مطالعاتی در زمینه مکانیسم سمیت در غشاء سلول ماهی به ویژه ماهی گل خورک به عنوان گونه مناسب شاخص زیستی صورت نگرفته است.

میزان همولیز گلبول قرمز پس از قرار گیری در معرض ترکیبات با غلظت حاد (Acute Potency Divisor) افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه های شاهد ۱ (شامل مخلوط گلبول قرمز و بافر) و شاهد ۲ (مخلوط گلبول قرمز و بافر و حلال سیکلوهاگزان) نشان می دهد ($p < 0.05$). تاثیرات معنی دار بر روی ساختار و قوام غشاء سلولی در نتیجه ورود ترکیبات چربی دوست نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به غشاء انتظار می رود. این تغییرات به میزان زیادی تحت تاثیر نوع ترکیبات است. همچنین این تغییرات بستگی به میزان قطبیت و در نتیجه محل اثرگذاری در غشای دولایه است. برای هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای محل تجمع اصلی آنها در بخش مرکز و چربی دار غشاء دولایه است. این ترکیبات توانایی تحریک تشکیل دندان و یا تشکیل کاپ را در غشاء سلول دارا می باشند. هیدروکربن ها در فضای بین رشته های acyl فسفولیپید ها یا در فضای مقابل دولایه قرار می گیرند (Rodrigues *et al.*, 2011). اندرکنش و واکنش این ترکیبات با زنجیره acyl فسفولیپید منجر به افزایش حجم این زنجیره ها و در نتیجه حجم غشاء می گردد. بنابراین گسترش و افزایش حجم غشاء گلبول قرمز می تواند ناشی از تجمع ترکیبات چربی دوست در غشاء دولایه چربی باشد. البته تاثیر ترکیبات چربی دوست بر غشاء به میزان زیادی به عملکرد گروههای قطبی ترکیبات (گروههای هیدروکسیل) یا گروههای دارای شارژ (آنیونی-کاتیونی و...) بستگی دارد. ترکیبات چربی دوست همچنین بسته به محل تجمع، اثرگذاری متفاوتی نیز بر غشاء برجای می گذارند. میزان اثرگذاری همچنین با پراکنش غیر متقارن فسفولیپیدها در غشاء نیز مرتبط است. همچنین غیریکنواختی و تشکیل کلاستر (خوشه) توسط

چربی های غشاء می تواند به میزان زیادی بر تجمع ترکیبات چربی دوست و به هم ریختن ساختار غشاء سلول اثرگذار باشد (Sikkema et al., 1995; Barakat et al., 2005). به نظر می رسد ورود ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای با غلظت های حاد به غشاء سلول گلبول قرمز ماهی گل خورک و قرار گیری آن در بین زنجیره acyl فسفولیپید بر روی میزان حجم غشاء و در نهایت بر روی میزان پایداری و قوام آن و در نتیجه میزان همولیز آن تاثیر گذار بوده است.

ورود ترکیبات چربی دوست و اندرکنش با غشاء می تواند همچنین باعث تشکیل و زیکول نیز در غشاء سلول گردد (Sikkema et al., 1995).

مطالعات Sander mann در سال ۱۹۹۳ ناشی از تاثیرات دارو و مواد بیهوش کننده بر غشاء گلبول قرمز نشان می دهد که این مواد چربی دوست باعث تشکیل و زیکول و نیز افزایش حجم غشاء و در نتیجه افزایش میزان همولیز غشاء گردیده اند.

ورود ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای همچنین منجر به تغییر در حلقه هایی که در اطراف پروتئین های غشاء وجود دارند می گردد، که این تغییرات منجر به تغییر در ترکیب پروتئین ها می گردد. از آنجایی که پروتئین های موجود در غشاء سیتوپلاسمی اغلب اوقات به صورت آنزیم های احاطه شده غشایی هستند مشخص شده است که اثرات سمی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می تواند ناشی از تاثیرات بر اندرکنش های بین چربی - پروتئین و اندرکنش های چربی - چربی باشد. ورود ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای منجر به هم ریختن اندرکنش های چربی - چربی و پروتئین - چربی موجود در غشاء می گردد. این عوامل در نهایت می تواند منجر به افزایش میزان لیز شدن غشاء سلول گردد (Sikkema et al., 1995).

از سوی دیگر تغییرات فوق الذکر در میزان پایداری و قوام غشاء سلول می تواند بر روی عملکرد و کارکرد غشاء نیز اثرگذار باشد. به طور کلی عملکردهای غشاء سلول عبارتند از: ۱- عملکرد حفاظتی به عنوان یک سد و انتقال و هدایت انرژی، ۲- تشکیل یک شبکه برای پروتئین ها (آنزیم ها).

غشاء به عنوان یک سد انتخابی برای یون ها و مواد مهم عمل می کند. تغییر در ساختار غشاء سلول ناشی از هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می تواند منجر به تغییر در جریان غیرفعال یونی از خلال غشاء گردد. البته ساختار و ترکیب فسفولیپیدها در غشاء سلول گونه های مختلف متفاوت است و در این پروسه تاثیر گذار است. از این رو در کنار تغییر در ساختار غشاء تغییر در وضعیت انرژی سلول می تواند منجر به تغییر در هموستازی سلول گردد.

پروتئین های زیادی نظیر ATPase، پروتئین های انتقالی، ترانسفرازها و... در غشاء سلول قرار دارند. شمار زیادی از این پروتئین ها توسط مولکول های چربی احاطه شده اند. تجمع ترکیبات چربی دوست نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای منجر به تاثیرگذاری برواکنش (اندرکنش) بین چربی های احاطه-کننده و پروتئین ها می گردد. علاوه براین، ترکیبات چربی دوست نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می توانند با بخش های چربی دوست پروتئین واکنش نشان دهند (Sikkema et al., 1995).

تغییر در میزان پایداری و قوام غشاء سلول همچنین می تواند ناشی از تغییر در اندرکنش بین پروتئین-پروتئین باشد (Walencik et al., 2007).

در کنار تغییرات ذکر شده در ساختار و عملکرد غشاء سلول، فعالیت های آنزیمی غشاء نیز در نتیجه ورود و تجمع ترکیبات چربی دوست نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای دچار تغییر می گردند (Moeckel et al., 2002).

نتایج نشان می دهد که میزان همولیز گلبول قرمز ماهی گل خورک که در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با غلظت های نزدیک به محیط طبیعی قرار گرفته است، افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه های شاهد ۱ (شامل مخلوط گلبول قرمز و بافر) و شاهد ۲ (مخلوط گلبول قرمز و بافر و حلال سیکلو هگزان) ندارد ($p > 0.05$). اندرکنش بین هیدروکربن و زنجیره acyl منجر به هم خوردن تعادل ارتباط بین زنجیره ها می گردد که در نتیجه نظم و ترتیب زنجیره ها به هم می ریزد. به هم خوردن تعادل ارتباط بین زنجیره ها در وهله اول توسط واکنش با لایه فسفولیپید مقابل آن جبران می گردد، ولی با افزایش ورود این ترکیبات واکنش جبرانی توسط لایه مقابل اثرات خود را از دست می دهد و نظم غشاء به هم می ریزد (Sikkema et al., 1995). به نظر می رسد ورود ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در غلظت های نزدیک محیط طبیعی به درون غشاء و جایگیری بین زنجیره های فسفولیپید یک لایه غشاء توسط لایه فسفولیپید مقابل جبران شده است. در واقع این میزان از غلظت بر روی پایداری و قوام غشاء سلولی تاثیر گذار نبوده است. از سوی دیگر به نظر می رسد غلظت های نزدیک محیط طبیعی این ترکیبات بر روی عملکرد غشاء سلول نیز تاثیر زیادی برجای نگذاشته اند.

نتایج نشان می دهد که میزان این خاصیت همولیتیک ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با افزایش مدت زمان در معرض قرار گیری، افزایش میزان وزن مولکولی و تعداد حلقه های ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای افزایش می یابد.

یکی از فاکتورهای موثر در میزان نفوذ و بروز اثرات سمیت فیزیولوژیک ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای میزان K_{ow} است. با این وجود ویژگی و ترکیب چربی های غشاء نیز به میزان زیادی بر رفتار نفوذپذیری و پراکنش این ترکیبات از خلال غشاء زیستی نقش دارند. مطالعات قبلی نشان می دهد که ترکیبات با وزن مولکولی کمتر نسبت به ترکیبات با وزن بالاتر دارای سمیت بیشتری برای میکروارگانیسم ها هستند. مطالعات همچنین بیانگر افزایش میزان سمیت این ترکیبات با کاهش ویسکوزیته ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای است. به طور کلی به نظر می رسد هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای دارای اثرات سمی اختصاصی بر روی غشای سلول هستند با این حال میزان این تاثیرات در مقابل تاثیرات سمی ناشی از مشتقات اکسید شده این ترکیبات بسیار کم و ناچیز است (Andrysik *et al.*, 2005).

تجمع ترکیبات چربی دوست در غشاء سلولی منجر به از بین رفتن پایداری و قوام آن می شود که این مسئله در مطالعات متعددی به ویژه در انواع میکروارگانیسم ها مشاهده شده است. (Barakat *et al.*, 2005; Sandermann *et al.*, 1993; Rodrigues *et al.*, 2011; Moeckel *et al.*, 2002; Walencik *et al.*, 2007; Sikkema *et al.*, 1994, 1995).

نتایج حاصل از مقایسات چندگانه (آزمون توکی) نشان می دهد میزان همولیز گلبول قرمز در غلظت های مختلف ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری بستگی دارد ($p < 0.05$). بنابراین میزان همولیز سلول گلبول قرمز ماهی گل خورک پس از قرار گیری در معرض ترکیبات مختلف آلاینده هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می تواند منعکس کننده مناسبی از غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری آلاینده در گذشته باشد.

نتایج نشان دهنده وجود خاصیت آنتی همولیتیک ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با غلظت مزمن (Chronic Divisor Potency) در مقایسه با دیگر غلظت ها است. ایجاد خاصیت آنتی همولیتیک توسط ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای تعجب آور است چرا که انتظار می رود این ترکیبات سبب کاهش میزان پایداری و قوام غشاء سلول گلبول قرمز ماهی گل خورک گردند.

یک فرضیه در این مورد این است که ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با دارا بودن ضریب اکتانول-آب بالا (K_{ow}) تمایل زیادی به قسمت های با ساختار چربی زیاد در غشاء دارند. ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای ترجیحا به قسمت های چربی دار غشاء ترکیب می شوند که منجر به جداسازی مناطق غنی از چربی و پروتئین می گردد. خوشه بندی پروتئین ها منجر به بهبود بخشیدن

اندرکنش های متقابل بین آنها می شود. صرف نظر از این، اندرکنش چربی ها با پروتئین ها منجر به ایجاد مناطق گسترش یافته در غشاء دولایه ای نیز می گردد (Barakat et al., 2005).

از سوی دیگر ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می توانند ظرفیت ترکیب کاتیون های دو ظرفیتی را افزایش دهند که این افزایش ظرفیت منجر به افزایش اثرات تراکمی و در نتیجه کاهش بی نظمی فیزیکی را منجر می شود. این اثر تشدید منجر به افزایش قوام واستحکام ترکیبات غشاء می گردد که منجر به افزایش مقاومت غشاء نسبت به اثرات هیپواسموتیک می گردد. بررسی دیگر محققان نشان داد که یون کلسیم (Ca^{++}) و دیگر کاتیون های دو ظرفیتی در فضای درون سلولی تغییر شکل و انقباض (چروکیدگی) سلول های گلبول قرمز را تحریک می کنند، به اضافه اینکه اضافه کردن کاتیون ها در خلال تست همولیز می تواند از تخریب غشاء گلبول قرمز جلوگیری کند. کاتیون های دو ظرفیتی همچنین می توانند با برقراری اتصال بین ترکیبات غشاء منجر به افزایش پایداری غشاء گردد (Barakat et al., 2005).

Speare در سال ۲۰۰۳ در مطالعات خود خاصیت آنتی همولیتیک آلاینده DDT را برای سلول گلبول قرمز ابراز داشت.

Barakat و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشابه این روند را در زمان قرارگیری گلبول قرمز ماهی (*Tilapia niloticus*) در معرض دو نوع آلاینده decamathrin و lindane مشاهده کردند.

تاثیر کلی و مجموع موارد ذکر شده منجر به کاهش میزان کمبودهایی که در پیوستگی بین چربی و پروتئین وجود دارد می گردد و بنابراین می تواند منجر به تقویت اندرکنش های چربی-چربی و پروتئین-پروتئین گردد. بنابراین به نظر می رسد این واکنش های ترکیبی منجر به افزایش پایداری و دوام غشاء سلولی ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* نسبت به لیز شدن تحت شرایط اسمتیک گردیده است. مکانیسم های ذکر شده می تواند همچنین ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را به عنوان ترکیبات دارای خاصیت آنتی همولیتیک معرفی نماید.

۵-۶ ارزیابی پاسخ های فیزیولوژیک مورد بررسی به عنوان بیومارکر ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ماهی گل خورک

به نظر می رسد وجود رابطه معنی دار قوی بین تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و بیوستز آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز در بافت کبد ماهی گل خورک نشانگر نقش این آنزیم در زمان

قرارگیری در معرض این ترکیبات است. با در نظر گرفتن نتایج فوق به نظر می رسد آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز می تواند بیومارکر مناسبی از قرارگیری ماهی گل خورک در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای محسوب گردد. این امر می تواند استفاده از این آنزیم را به عنوان بیومارکر این ترکیبات در ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* در برنامه های بیومانیترینگ محیط توسعه بخشد. لازم به ذکر است که در زمان استفاده از آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در بیومانیترینگ محیطی می بایست پاسخ های فیزیولوژیک ارگانسیم نسبت به عوامل استرس زا، فاکتورهای زیستی و غیرزیستی مد نظر قرار گیرند.

استفاده از تست **NRR time** در گونه های مختلف و نسبت به عوامل آلاینده مختلف پیشنهاد شده است. از این رو مطالعه مکانیسم آن در گونه های مختلف به ویژه گونه هایی که به عنوان شاخص زیستی مورد استفاده قرار می گیرند دارای اهمیت بسزایی است. با این حال گستردگی استفاده از این تست در گونه های مختلف و نسبت به عوامل آلاینده مختلف نشان می دهد که از این تست می توان به عنوان بیومارکر کلی در ارزیابی سطح سلامت اکوسیستم های دریایی در طرح های پایش زیست محیطی استفاده کرد.

استفاده از پایداری غشاء لیزوزوم به عنوان یک بیومارکر غیراختصاصی و مفید جهت بررسی حضور آلاینده های آلی به ویژه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به میزان زیادی مورد استفاده قرار گرفته است (Einsporn *et al.*, 2002; Cajaraville *et al.*, 2000; Broeg *et al.*, 2002; Schiedek *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2006; Köhler *et al.*, 2002; Galloway *et al.*, 2002; Wedderburn *et al.*, 2000; 2006a).

وجود رابطه معنی دار قوی بین تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و میزان **NRR time** در نمونه های خون ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* نشان می دهد که میزان **NRR time** به عنوان شاخص حساس و دقیق از تاثرات و آسیب های وارد شده به لیزوزوم در ماهی گل خورک است. از این تکنیک می توان در بررسی میزان کاهش سطح سلامت موجود در زمان قرار گیری در غلظت های پایین آلاینده هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای استفاده کرد. همچنین از این تست می توان به عنوان یک بیومارکر مناسب در اعلام خطر اولیه پس از قرار گیری موجود در معرض آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای استفاده نمود. با در نظر گرفتن نتایج فوق به نظر می رسد میزان **NRR time** می تواند بیومارکر مناسبی از قرارگیری ماهی گل خورک در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای محسوب گردد.

استفاده از تست EOF می تواند نشانگر مناسبی از ارزیابی اثرات آلودگی بر ماهی باشد (El-Gawahir *et al.*, 2004). این تست میزان قوام و پایداری غشاء سلول را در زمان قرار گیری در معرض استرس های محیطی نشان می دهد. با این حال غشاء سلول می تواند نسبت به طیف گسترده ای از تغییرات واکنش نشان دهد. ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به دلیل ویژگی های خاص خود نظیر خاصیت چربی دوستی بالا، تمایل زیادی به تجمع در بخش های چربی دار بافت ها دارند. غشاء سلول به عنوان یک بخش مهم که دارای میزان زیادی چربی است می تواند محلی برای تجمع این ترکیبات محسوب شود، از سوی دیگر این ترکیبات برای ورود به سلول نیاز به عبور از غشاء دارند. بنابراین ویژگی های غشاء سلول در کنار ویژگی های خاص ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای نسبت به سایر آلاینده های غیر آلی، تست EOF را می تواند گزینه مناسبی در بررسی اثرات این آلاینده و استفاده به عنوان بیومارکر نماید (El-Gawahir *et al.*, 2004). وجود رابطه معنی دار بین تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و میزان پایداری غشاء (تست EOF) نشان می دهد که این ترکیبات و یا تولیدات آنها به عنوان فاکتور هایی دارای خاصیت همولیز کننده عمل کرده اند. از این رو بررسی ها در شرایط محیط طبیعی نشان می دهد که تست میزان پایداری غشاء شاخص مناسبی از قرارگیری ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* در معرض آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای است. اما نتایج بررسی ها در شرایط آزمایشگاهی و در زمان قرار گیری سلول های گلبول قرمز در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای نشان می دهد که این ترکیبات دارای خاصیت آنتی همولیتیک (خاصیت ضد همولیز) نیز می باشند که در غلظت های مزمن می توانند باعث افزایش مقطعی و نه طولانی مدت میزان پایداری غشاء سلول گردند. وجود این ویژگی سبب می گردد تا استفاده از تست میزان پایداری غشاء گلبول قرمز در ماهی گل خورک به عنوان بیومارکر ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مورد تردید واقع گردد. از این رو بررسی های بیشتر همزمان آزمایشگاهی و محیط طبیعی جهت استفاده از تست میزان پایداری غشاء به عنوان بیومارکر ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ضروری به نظر می رسد.

لازم به ذکر است که استفاده از یک بیو مارکر نظیر ثبات لیزوزومی در برنامه های بیومانیورینگ صحیح نمی باشد. در واقع، در ارزیابی اثرات آلاینده ها بر ارگانسیم های آبی، استفاده از مجموعه بیومارکر ها جهت دستیابی به اطلاعات دقیق تر در مورد وضعیت فیزیولوژیک موجودات ضروری می باشد. در زمان استفاده از بیومارکر ها نظیر آنچه در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است می بایست مد نظر قرار گیرند (Slatinsk *et al.*, 2008):

*تکنیک های مورد استفاده در سنجش و بررسی می بایست مورد اطمینان، بادقت بالا، ساده و قابل انتقال باشد.

*میزان سطوح اولیه بیومارکر را جهت تشخیص بین تغییرات طبیعی در میزان آن و تغییرات در پاسخ به عوامل استرس زا می بایست بدانیم.

*تمام فاکتورهای داخلی و خارجی اثرگذار بر ارگانسیم حتی تغییراتی که با حضور آلاینده ها ارتباطی ندارند را می بایست کاملاً شناسایی کرد.

*می بایست شناسایی کنیم که آیا تغییر در سطوح بیومارکر به خاطر تغییرات موقتی فیزیولوژیک ارگانسیم است یا در اثر حضور عوامل آلاینده.

*تغییرات در سطوح پایه بیومارکر را می بایست در ارتباط با سطح سلامت ارگانسیم مورد بررسی قرار دهیم.

۵-۷ نتیجه گیری:

خلیج فارس به عنوان یکی از اکوسیستم های آلوده از نظر آلودگی نفتی محسوب می شود. اما این مطالعه نشان داد که غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در شمال غرب خلیج فارس و در سواحل خوزستان از استانداردهای موجود بالاتر نیست. حضور ترکیبات با وزن مولکولی کم و ساختار حلقه ای باتراکم پایین نشان دهنده غالبیت آلودگی با منشا پتروژنیک و دربرخی موارد پیرولیتیک در شمال غرب خلیج فارس است. بیومارکرهای استفاده شده در این بررسی نظیر آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز، ثبات لیزوزومی و میزان همولیز گلبول قرمز در ماهی گل خورک حساسیت زیادی را نسبت به آلودگی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای نشان دادند که این ماهی را به عنوان گونه مناسبی به عنوان شاخص زیستی معرفی می کند. وجود رابطه معنی دار بین بیومارکرها و آلودگی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای نشان می دهد که این ترکیبات در مناطق نمونه برداری در دسترس زیستی ماهی گل خورک قرار دارند. نتایج این بررسی نشان می دهد که مطالعه بیومارکرها نه تنها در ارزیابی تاثیرات بیولوژیک و فیزیولوژیک آلاینده ها بر آبزیان اثرگذار هستند بلکه در تعیین و ارزیابی در دسترس بودن زیستی عوامل آلاینده اثرگذار هستند. استفاده از مجموع بیومارکرها در پایش زیستی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و بررسی تاثیرات آن بر ماهیان نتایج دقیق تر و کامل تری از وضعیت سلامت اکوسیستم ارائه می دهد.

پیشنهادهات:

- ۱- توسعه و گسترش روش های آنالیز سریع و ارزان انواع بیومارکر ها به عنوان گامی بلند در گسترش استفاده از بیومارکرها.
- ۲- بررسی ژنی ترجمه آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز جهت ارزیابی سریع تر و دقیق تر از سطوح آلودگی.
- ۳- بررسی سایر عوامل تاثیر گذار بر بیومارکر ها.
- ۴- بررسی بیومارکرها در انواع گونه های مختلف آبزیان به ویژه در خلیج فارس در جهت تعیین گونه مناسب به عنوان شاخص زیستی.
- ۵- استاندارد سازی و بومی سازی روش های نمونه گیری، استخراج و سنجش بیومارکر ها در کشور جهت کاهش تغییرات در سطوح آنها.
- ۶- توسعه استفاده از بیومارکرها به عنوان پایین ترین سطوح پاسخ به استرس در برنامه های بیومانیتورینگ محیط.
- ۷- سنجش و بررسی انواع دیگری از بیومارکرها در کنار یکدیگر جهت آگاهی بیشتر از وضعیت سلامت اکوسیستم.

- [۱] دهقان مدیسه سیمین، غفله مرمضی جاسم، سواری احمد، کوچینین پریتا، ۱۳۷۹، فراوانی، تنوع و پراکندگی لارو ماهیان در خورها و سواحل غرب خوزستان، مجله علمی شیلات ایران (فارسی); ۹(۲): ۴۱-۶۰
- [۲] Aas, E., Jonsson, G., Sundt, R.C., Westerlund, S., Sanni, S., 2006. Monitoring of PAH Metabolites and Metals in Bile from Caged Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and Wild Pelagic Fish Along Expected Contaminant Gradients in the North Sea. In: Hylland, K., Lang, T., Vethaak, A.D. (Eds.), Biological Effects of Contaminants in Marine Pelagic Ecosystems. SETAC, Brussels, pp. 5236–5276.
- [۳] Abdel-Raheem, M.S., El-Hussieni, Z.M., Ragab, N., Al-Gohary, E., 2009. Study of Erythrocyte Superoxide Dismutase, Plasma Malondialdehyde and Osmotic Fragility Test in Psoriasis. Vol. 20, No. 1.
- [۴] Abdel-Rahman, M.S., Skowronski, G.A., Turkall, R.M., 2002. Assessment of the dermal bioavailability of soil-aged benzo[a]pyrene. Human and Ecological Risk Assessment. 8(2): 429-441.
- [۵] Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla Anguilla* L. following in situ harbor water exposure. Ecotoxicol Environ. Safety, 57: 290-302.
- [۶] Aklillu, E., Oscarson, M., Hidestrand, M., Leidvik, B., Otter, C. Ingelman-Sundberg, M., 2002. Functional analysis of six different polymorphic CYP1B1 enzyme variants found in an Ethiopian population. Mol. Pharmacol., 61, 586-594.
- [۷] Aldrich, K., Saunders, D.K., 2000. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures, Journal of Thermal Biology 26 (2001) 179–182.
- [۸] Ali, F. Kh, A. M., El-Shehawi, M., Seehy, A., 2008. Micronucleus test in fish genome: As Sensitive monitor for water pollution. African J. Biotechnol., 7(5): 606-612.
- [۹] Amado, L.L., Robaldo, R.B., Geracitano, L., Monserrat, J.M. and Bianchini, A., 2006a. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). Marine Pollution Bulletin. 52, 207.
- [۱۰] Anderson, JW., Newton, FC., Hardin, J., Tukey, RH., Richter, KE., 1996. Chemistry and toxicity of sediments from San Diego Bay, including a biomarker (P450 RGS) response. In: Bengtson DA, Henshel DS (eds) Environmental toxicology and risk assessment. Biomarkers and risk assessment (Vol. 5), ASTM STP 1306. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 53–78.

- [١٢] Andrysik, Z., Machala, M., Chramostova, K., Hofmanova, J., Kozubik, A. & Vondracek, J., 2005. Activation of ERK1/2 and p38 kinases by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells is associated with induction of apoptosis. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 211, 198-208.
- [١٣] Bado-Nilles A, Gagnaire B, Guyon H.T, Le Floch. S and Renault T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro* Volume 22, Issue 6, Pages 1610-1617.
- [١٤] Balu, N., Padgett, W.T., Lambert, G.R., Swank, A.E., Richard, A.M. & Nesnow, S., 2004. Identification and characterization of novel stable deoxyguanosine and deoxyadenosine adducts of benzo[*a*]pyrene-7,8-quinone from reactions at physiological pH. *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 827-838.
- [١٥] Barakat, K.K., 2005. Effect of certain insecticides on the stabilization and lysis of human and fish erythrocyte. *Res J AgrBiol Sci*, 1: 195-99.
- [١٦] Bard Shannon Mala. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Volume 48, Issue 4, Pages 357–389.
- [١٧] Barton, H.A., Cogliano, V.J., Flowers, L., Valcovic, L., Setzer, R.W. & Woodruff, T.J., 2005 Assessing susceptibility from early-life exposure to carcinogens. *Environ. Health Perspect.*, 113, 1125-1133.
- [١٨] Bashe, W.J., and Baker, T.V., 1990. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection. U.S. EPA Method 550.1: 143-167. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Ohio, U.S.A.
- [١٩] Bekatas, S. and Ayik, O., 2010. Alteration in erythrocyte osmotic fragility and erythrocyte membrane fatty acid profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) experimentally infected with *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9(19): 2472-2476.
- [٢٠] Bresler, V., Bissinger, V., Abelson, A., Dizer, H., Sturm, A., Kratke, R., Fishelson, L., Hansen, P. D., 1999. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgolander Marine Research*, 53, 219–243.
- [٢١] Broeg, K., Kohler, A., Westernhagen, H.V., 2002. Disorder and recovery of environmental health monitored by means of lysosomal stability in liver of European flounder *Platichthys flesus* L. *Mar. Environ. Res.* 54, 569–573.

- [٢٢] Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J., 1998. Concentration of PAH in various marine organisms in relation to those in sediments to trophic level. *Mar. Poll. Bull.*, 36: 951-960.
- [٢٣] Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian peninsula: a practical approach. *Sci. Tot. Environ.*, 247: 295–311.
- [٢٤] Camus, L., Grosvik, B. E., Borseth, J. F., Jones, M. B., & Depledge, M. H., 2000. Stability of lysosomal and cell membranes in haemocytes of the common mussel (*Mytilus edulis*): effect of low temperatures. *Marine Environmental Research*, 50, 325–329.
- [٢٥] Canli, M., Atli, G., 2003. The relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environ. pollut.* 121: 129-136.
- [٢٦] Carney Almroth, B., Sturve J., Stephensen, E., Holth, T.F., Förlin, L. (2008). Protein carbonyls and antioxidant defences in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. (Accepted, *Marine Environmental Research*).
- [٢٧] Catsiki, V., Hatzianestis, I., Strogyloudi, E., Belou, O., Gogou, M., Rigas, F., 2001. Distribution of metals and organic contaminants in mussels from Thermaikos Gulf. *Proceedings of the 7th International Conference on Environmental Science and Technology*. vol. A Syros island, Greece, September, 106–113.
- [٢٨] CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment), 2010. Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental and Human Health Effects). *Scientific Criteria Document* (revised). 216 pp.
- [٢٩] Chambers, J.E, Boon, S.J, Carr, R.L, Chambers, H.W and Straus, D.L., 2002. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Hum. Ecol. Risk Assess*; 8: 165-176.
- [٣٠] Cheung, V.V., Wedderburn, R.J., Depledge, M.H., 1998. Molluscan lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of a pollution gradient in Tolo Harbour, Hong Kong. *Mar. Environ. Res.* 46 (1), 1–5.
- [٣١] Chimezie, A., Ogbechea, A., Palmerb, P., Cokera, H., 2005. determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *Journal of Chromatography A*, 1073, 323–330.

- [٣٢] Clinton, H.I. Ujagwung, G.U. Horsfall, M., 2009. Evaluation of total hydrocarbon levels in some aquatic media in an oil polluted mangrove wetlands in the Niger delta. *Applied ecology and environmental research*. 7(2): 111-120.
- [٣٣] Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*. 56. 443–470.
- [٣٤] Danischewski, D., 2006. AChE and GST Activities in cod, *Gadus morhua*, caged along two North Sea transects. In: Hylland, K., Lang, T., Vethaak, A.D. (Eds.), *Biological Effects of Contaminants in Marine Pelagic Ecosystems*. SETAC, Brussels, pp. 301–310.
- [٣٥] De Smet, H. & Blust, R., 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure, *Ecotoxicol Environ. Saf.*, 48(3):242-255.
- [٣٦] Domouhtsidou, G. P., Dimitriadis, V.K., 2001. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environmental Pollution*, 115, 123–137.
- [٣٧] Durand, C., Ruban, V., 2004. Characterization of the organic matter of sludge: determination of lipids, hydrocarbons and PAHs from road retention/infiltration ponds in france. *Environmental Pollution*, 132, 375–384.
- [٣٨] D.W.T. Au., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* 48, 817–834.
- [٣٩] Eghtesadi, P., Riazi, G., Taghikhani, M., and Ranaei Siadat S. O., 2002. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the northern Persian Gulf as indicated by kinetic and thermodynamic criteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(5), 704-11.
- [٤٠] Einsporn, S., Broeg, K. and Köhler, A., 2005. toxic effects of transported contaminants in flatfish and mussel of the Wadden Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, 50: 423–429.
- [٤١] El-Gawahir., Bin-Dohaish, E.I., Saydah, Abdel-Aziz., Nawal, A.El-Ghazaly., 2004. The Toxic Effect of Pollutants in the Aquatic Environment on the Kidney and Blood Picture of Rabbit Fish *Siganus rivulatus* (Forskal) from the Red Sea, Jeddah, Saudi Arabia. *JKAU.:Mar.Sci.*, vol.15, pp:3-22.

- [୧୧] Fernley, P. W., Moore, M. N., Lowe, D. M., Donkin, P., & Evans, S., 2000. Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells. *Marine Environmental Research*, 50, 451–455.
- [୧୨] Fowler, S.W., Readman, J.W., Oregioni, J.P., Villeneuve., and McKay, K., 1993. Petroleum Hydrocarbons and Trace Metals in near shore Gulf Sediments and Biota Before and after the 1991 War: An Assessment of Temporal and Spatial Trends. *Marine Pollution Bulletin*, 27: 171-182.
- [୧୩] Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T. and Renault, T., 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 22, 1-14.
- [୧୪] Galloway, T.S., Sanger, R.C., Smith, K.L., Fillmann, G., Readman, J.W., Ford, T.E. and Depledge, M.H., 2002. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environ.Sci.Technol.*, 2002, 36: 2219–2226.
- [୧୫] Geral, k., 2010. cell and molecular biology, 6th edition, John Wiley & Sons, Inc.
- [୧୬] Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jokoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase. The first enzyme step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.
- [୧୭] Havelkova, M., Randak, T., Blahova, J., Slatinska, I., Svobodova, Z., 2008a. Biochemical markers for the assessment of aquatic environment contamination. *Interdisc Toxicol*. Vol. 1(2): 169–181.
- [୧୮] Havelková, M., Slatinská, I., Šíroková, Z., Blahová, J., Krijt, J., Randák, T., Žlábek, V., Haruštiaková, D., Jarkovský, J., Svobodová, Z., 2008b. Use of Biochemical Markers for the Assessment of Organic Pollutant Contamination of the Vltava River, Czech Republic. *Acta vet. brno*, 78: 513-524.
- [୧୯] Hellou, J., Payne, J. F., and Hamilton, C., 1993. GC-MS Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds in Cod (*Gadus morhua*) from the Northwest Atlantic. *Environmental Pollution*, 85: 197-202.
- [୨୦] Henson, K.L., Stauffer, G., Gallagher, E.P., 2001. Induction of glutathione S-transferase activity and protein expression in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) liver by ethoxyquin. *Toxicol Sci*, 62: 54-60.
- [୨୧] Hu, N.J., Shi, X.F., Huang, P., Liu, J.H., 2009a. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of Laizhou Bay, Bohai Sea, China. *Environ Earth Sci*, (revised)
- [୨୨] Hu, N.J., Shi, X.F., Liu, J.H., Huang, P., Liu, Y.G., Liu, Y., 2009b. Concentrations and possible sources of PAHs in sediments from Bohai Bay and adjacent shelf. *Environ Earth Sci*, doi:10.1007/s12665-009-0313-0.

- [٥٤] ICES.,1997. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments: Analytical methods. In Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment, ICES Cooperative Research Report, 222: 118–124.
- [٥٥] ICES., 2004. Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. By M.N. Moore, D. Lowe, and A. Köhler. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, No. 36. 31 pp.
- [٥٥] ISO 17993 ,2002.Water quality-Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons in water by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extrattion.
- [٥٦] Jerina, D.M., Lehr, R., Yagi, H., Hernandez, O., Dansette, P., Wislocki, P.G., Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W. & Conney, A.H., 1976. Mutagenicity of benzo(a)pyrene derivatives and the description of a quantum mechanical model which predicts the ease of carbonium ion formation from diol epoxides. In: deSerres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. & Philpot, R.M., eds, In Vitro Metabolic Activation and Mutagenesis Testing, Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical, pp. 159-177.
- [٥٧] Jones, D.P., Brown, L,S,, Sternberg, P., 1995.Variability in glutathione-dependent detoxification in vivo and its relevance to detoxification of chemical mixtures. Toxicology 105: 267-274.
- [٥٨] Kalay,M.,Ay,O and Canli ,M.,1999.Heavy metal concentrations in fish tissues form the Northeast Mediterrenean Sea. Bull. Environ. contam.Toxical.63, 673-681.
- [٥٩] Khan, N.Y., 2002. Physical and human geography. In: Khan, N.Y., Munawar, M., Price, A.R.G. (Eds.), The Gulf Ecosystem: Health and Sustainability. Bakuys Publishers, Leiden, pp. 3–21.
- [٦٠] Kim P.M. Deboni. U. Wells P.G.,1997. Peroxidase-Dependent Bioactivation and Oxidation of DNA and Protein in Benzo[a]Pyrene-Initiated Micronucleus Formation. Free Radical Biology and Medicine. Volume 23, Issue 4, Pages 579–596.
- [٦١] Kim, GB., Maruya, KA., Lee, RF., Lee, JH., Koh, CH., Tanabe, S., 1999. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Kyeonggi Bay, Korea. Mar Pollut Bull, 38:7–15.
- [٦٢] Klumpp, D., Huasheng, H., Humphrey, C., Xinhong, W., & Codi, S.,2002. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. I. Organic pollutants in mussel and fish tissues. Marine pollution bulletin, 44(8), 752-760.

- [٦٣] Kohler, A., Wahl, E., S€offker, K., 2002. Functional and Morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.)). Environ. Toxicol. Chem. 21, 2434–2444.
- [٦٤] Kroemer, G., Jäätelä, M., 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. Nature Reviews Cancer 5, 886-897 ,doi:10.1038/nrc1738.
- [٦٥] Kubilay, A. & Ulukoy, G., 2002. The effects of acute Stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turk J. Zool. 26: 249-254.
- [٦٦] Law, R.J., Dawes, V.J., Woodhead, R.J., Matthiessen, P.,1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in sea water around England and Wales. Marine Pollution Bulletin, 34 (5), 306–322.
- [٦٧] Lemke, M.A., Kennedy, C.J.,1997. The uptake, distribution and metabolism of benzo(a)pyrene in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr-smolt transformation. Environ. Toxicol. Chem, 16, 1384–1388.
- [٦٨] Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D.,1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. Environ. Manage, 19, 18–97.
- [٦٩] Lowe, D. M., Moore, M. N., & Evans, B. M.,1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. Marine Ecology Progress Series, 91, 135–140.
- [٧٠] Lowe, D. M., Fossato, V. U., Depledge, M.H.,1995. Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venicelagoon: an in vitro study. Marine Ecology Progress Series, 129: 189–196.
- [٧١] Luzio, J. P., 2007. Lysosomes: fusion and function. Nature Revs. Mol. Cell Biol. 8: 622–632.
- [٧٢] Mackay, D.M., and Shiu, W.Y., 1991. Estimating the multimedia partitioning of hydrocarbons: the effective solubility approach, vol. 2, p. 137–154. In P. T. Kostecki (ed.), Hydrocarbon contaminated soils & groundwater: analysis, fate, environmental & public health effects, & remediation. Lewis Publishers Inc., Boca Raton, Fla.
- [٧٣] Malins, D. C., Krahn, M. M., Myers, M. S., Rhodes, L. D., Brown, D. W., Krone, C. A., McCain, B. B., and Chan, S. L.,1994. Toxic Chemicals in Sediment and Biota from a Creosote-polluted Harbor: Relationships with Hepatic Neoplasms and Other Hepatic Lesions in English sole (*Parophrys vetulus*). Carcinogenesis (London.), 6: 1463-1469.

- [٧٤] Marcovecchio, T.D. and Moreno, V.J. 1993. Cadmium, Zinc and total mercury levels in the tissues of several fish species La Plata River Estuary, Argentina. *Environ Monit Assess*; 25: 119-130.
- [٧٥] Martínez-Gómez C., Valdés J and Benedicto J., 2006. Lysosomal membrane stability in blue mussels as a tool in biomonitoring networks: Results of the Iberian Mediterranean coast (2002-2004). *Marine Environmental Research* 62, S1-S456. S360-S410. ISSN:0141-1136.
- [٧٦] Martins L.K.P., Nascimento I.A.,e, Fillmann G., . King R, EvangelistaA.J.A., Readman J.W., Depledge M.H.,2005. Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil. *Environmental Research*,99 387–396.
- [٧٧] Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U.,1995.Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms.*Rev. Environ. Contamin, T* 143, 79–165.
- [٧٨] Mensinger, A.E. Walsh, P. & Hanlon, R.T. 2005. Blood biochemistry of the oyster Toadfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17: 170-176.
- [٧٩] Moeckel GW, Shadman R, Fogel JM, Sadrzadeh SMH. Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. *Life Sci* 2002; 71: 2413-24.
- [٨٠] MOOPAM (Manual of oceanographic observations and pollutant analyses methods)., 1999. 3rd Ed. section 6, Regional organization for the protection of the marine environment (ROPME). Kuwait.
- [٨١] Moore, M.N., Allen, J.I. and McVeigh, A., 2006. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar. Environ. Res.* In press.
- [٨٢] Munkittrick, K.R., and McCarty, L.S., 1995. An integrated approach to aquatic ecosystem health: top-down, bottom-up or middle-out? *J. Aquat. Ecosystem Health*; 4: 77-90.
- [٨٣] Murdy, E.O., 1989. A taxonomic revision and cladistic analysis of the Oxudercine gobies(Gobiidae:Oxudercinae). *Records of the Australian Museum, Supplement*, 11: 1-93.
- [٨٤] Nasuti, C, Cantalamessa, F, Falcioni, G, Gabbianelli, R.,2003. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology* , 191: 233-44.

- [٨٥] Ningjing, Hu., Xuefa, Shi., Peng Huang., Jian Mao., Jihua Liu., Ying Liu., Deyi Ma., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of Liaodong Bay, Bohai Sea, China. *Environ Sci Pollut Res*, 11356-010-0359-2.
- [٨٦] NRCC., 1985. The role of biochemical indicators in the assessment of aquatic ecosystem health - their development and validation. National Research Council of Canada, Publication 24371, Ottawa. 119 p.
- [٨٧] Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ*, 309: 105-115.
- [٨٨] Pereira, W.E., Hostettler, F.D., Rapp, J.B., 1996. Distributions and fate of chlorinated pesticides, biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments along a contamination gradient from a pointsource in San Francisco Bay, California. *Mar Environ Res*, 41:299–314.
- [٨٩] Perugini, M., Visciano, P., Giammarino, A., Manera, M., Nardo, W. D., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy. *Chemosphere*. 66: 1904-1910.
- [٩٠] Polgar, G., 2010. The mudskipper, World Wide Web electronic publication, www.mudskipper.it (Accessed day/month/year).
- [٩١] Porte, C., Albaigés, J., 1993. Bioaccumulation Patterns of Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls in Bivalves, Crustaceans, and Fishes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26: 273-281.
- [٩٢] Qunfang, Z., Jianbin, Z., Jianjie, F., Jianbo, S., Guibin, J., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *analytica chimica acta* 606, 135–150.
- [٩٣] Rodrigues, H.G., Penha-Silva, N., Pereira de Araujo, M.F., Nishijo, H., Aversi-Ferreira, T.A., 2011. Effects of Roundup® Pesticide on the Stability of Human Erythrocyte Membranes and Micronuclei Frequency in Bone Marrow Cells of Swiss Mice. *The Open Biology Journal*, 4, 54-59.
- [٩٤] Rojas, M., Marie, B., Vignaud, J.M., Martinet, N., Siat, J., Grosdidier, G., Cascorbi, I. & Alexandrov, K., 2004. High DNA damage by benzo[*a*]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: Comparison with lung parenchyma. *Cancer Lett.*, 207, 157-163
- [٩٥] Rudneva Irina, I., Kuzminova Natalya, S., Skuratovskaya Ekaterina, N., 2010. Glutathione-S-Transferase Activity in Tissues of Black Sea Fish Species. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, vol 1 (1):141-150.

- [٩٦] Sandermann, H., Jr., 1993. Induction of lipid-protein mismatch by xenobiotics with general membrane targets. *Biochim. Biophys. Acta* 1150:130–133.
- [٩٧] Schiedek, D., Broeg, K., Barsiene, J., Lehtonen, K. K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjärvi, H., Vuorinen, P. J., Köhler, A., Balk, L., Schneider, R., 2006. Biomarker responses and indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and eelpout (*Zoarces viviparus*) from the western Baltic Sea. *Mar. Poll. Bull.*, 53: 387–405.
- [٩٨] Seibert, C.S., Guerra-Shinohara, E. M., Gomes de Carvalho, E., Marques, E.E., 2001. Red blood cell parameters and osmotic fragility curve of *Colossoma macropomum* (Pisces, Osteichthyes, Mileinae) in captivity. *Maringá*, v. 23, n. 2, p. 515-520.
- [٩٩] Sen, A. and Kirikbakan, A., 2004. Biochemical Characterization and Distribution of Glutathione S_Transferases in Leaping Mullet (*Liza saliens*). *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 69, No. 9, pp. 993-1000.
- [١٠٠] Sericano, J.L., Brooks, J.M., Champ, M.A., Kennicutt, M.C., Makeyev, Y.V., 2001. Trace contaminant concentrations in the Kara Sea and its adjacent rivers, Russia. *Mar. Pollut. Bull.*, 42, 1017–1030.
- [١٠١] Sikkema, J.F.J. Weber, H.H. J. de Bont, J.A.M., 1994. Cellular toxicity of lipophilic compounds: mechanisms, implications, and adaptations. *Biocatalysis* 10:113–122.
- [١٠٢] Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, p. 201–222.
- [١٠٣] Slatinskí, I., Smutný, M., Havelkovi, M., Svobodovi, Z., 2008. Review article: biochemical markers of aquatic pollution in fish, glutathione s transferase. *Folia veterinaria*, 52, 3-4: 129-13.
- [١٠٤] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150: 76–85.
- [١٠٥] Speare, R., 2003. Bibliography of lice parasitic on humans. *Public Health and Tropical Medicine*, J. Australia. 4811.
- [١٠٦] Stefanoni, M.F., Abessa, D.M.S., 2008. Lysosomal Membrane Stability of the brown mussel *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusca, Bivalvia) exposed to the anionic surfactant Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* (2008), 3 (1): 6-9.

- [107] Steimle, F.W., Zdauowicz, V.S., Gadbois, D.F., 1990. Metals and Organic Contaminants in Northwest Atlantic Deep-Sea Tilefish Tissues. *Marine Pollution Bulletin*, 21: 530-535.
- [108] Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M. Förlin, L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology*. 431-442.
- [109] Tolosa. Imma., Stephen, J., de Mora., Scott, W., Fowler, Jean-Pierre villeneuve., Jean Bartocci., Chantal Cattini., 2005. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 1619–1633.
- [110] Tuvikene, A., 1995. Response of fish to poly aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ann. Zool. Fennici*. 32:295-309.
- [111] Tziakas D.N. Chalikias G.K. Stakos D. Boudoulas, H., 2010. The role of red blood cells in the progression and instability of atherosclerotic plaque. *International Journal of Cardiology*. Volume 142, Issue 1, Pages 2–7.
- [112] UNEP/RAMOGÉ., 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens.
- [113] U.S. EPA., 2003. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms (PDF). PAH Mixtures. EPA-600-R-02-013. Office of Research and Development. Washington, DC.
- [114] Valavanidis, A., Vlachogianni, T.h., Triantafillaki, S., Dassenakis, M., Androutsos, F., Scoullas, M., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface seawater and in indigenous mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from coastal areas of the Saronikos Gulf (Greece). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79, 733–739.
- [115] Van der Oost, R., Beyer, J., Bermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149.
- [116] Walencik, J, Witeska, M., 2007. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp Bioch Physiol (Part C)*; 146: 331-5.
- [117] Wedderburn, J., McFadzen, I., Sanger, R.C., Beesley, A., Heath, C., Hornsby, M., Lowe, D., 2000. The field application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 257–267.

- [١١٨] Weis, J.,2002. Tolerance to Environmental Contaminants in the Mummichog, *Fundulus heteroclitus*. Human and Ecological Risk Assessment. 8, 933.
- [١١٩] Whyatt, R.M. Perera, F.P. Jedrychowski, W. Santella, R.M. Garte, S. Bell, D.A., 2000. Association between Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adduct Levels in Maternal and Newborn White Blood Cells and Glutathione S-Transferase P1 and CYP1A1 Polymorphisms. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. Vol. 9, 207–212.
- [١٢٠] William, G.M., Iatropoulus, M.J.,2002.Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. Toxicologic Pathology 30, 41-53.
- [١٢١] Yan, W., Chi, J.S., Wang, Z.Y., Huang, W.X., Zhang, G., 2009. Spatial and temporal distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) in sediments from Daya Bay, South China. Environ Pollut, 30:1–8.
- [١٢٢] Yilmaz, R.H., Turkoz. Y., Yüksel. E, Orun, Ý., 2006. An investigation of antioxidant enzymes activities in liver of *Cyprinus carpio* taken from different stations in the Karakaya Dam Lake. International Journal of Science and Technology 1, 1-6.
- [١٢٣] Yilmaz, F., Ocdemir, N., Demirak, A. and Tuna, A.L, 2007. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. Food chemistry; 100: 830-835.
- [١٢٤] Zuloaga, O., Prieto, A., Usobiaga, A., Sarkar, S.K., Chatterjee, M., Bhattacharya, B. D., Bhattacharya, A., AlamMd, A., Satpathy, K.K.,2009. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Intertidal Marine Bivalves of Sunderban Mangrove Wetland, India: An Approach to Bioindicator Species. Water Air Soil Pollut , 201:305–318.

Biogeochemical study of Poly Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and its physiological affection response in Mudskipper (*B. dussumieri*) at coast of Khuzestan

**By:
Mahmood Sinaei**

Abstract

Study on the biomarkers types to assess health status of marine ecosystems in environmental biomonitoring has an important value. Accordingly, accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediment, water and tissues (liver and gill) of mudskipper (i.e., *Boleophthalmus dussumieri*) and some physiological responses like lysosomal membrane change performed on haemocytes, stability of red blood cell membrane and the Glutathione-S Transferase (GST) activity in the liver were measured in mudskipper. Samples were obtained from five sites along north western coast of the Persian Gulf (Khuzestan coast). Red blood cell membrane changes after different concentration of PAHs at different time was also studied to evaluate impact of PAHs compound on cell membrane. PAHs concentration was measured by HPLC method. The activity of GST enzyme was analysed by spectrophotometric method. Lysosomal membrane change was measured by NRR time method and stability of red blood cell membrane was evaluated by EOF test. Total PAH concentrations in the coastal sea water, the sediments, the liver and the gill tissues ranged between 0.80-18.34 $\mu\text{g/l}$, 113.50-3384.34 ng g^{-1} (dry weight), 3.99-46.64 ng g^{-1} dw and 3.11-17.76 ng g^{-1} dw, respectively. Highest PAHs pollution was found at Jafari while the lowest was detected at Bahrakan sampling sites. The lowest enzymatic activity was identified at Bahrakan (7.19 ± 1.541 nmol/mg protein/min), while the highest was recorded at Jafari (46.96 ± 7.877 nmol/mg protein/min). Comparative analysis of GST activity in the liver of mudskippers showed significant difference ($p < 0.05$) between the locations of Jafari and Bahrakan, and with other sites. Moreover, no significant difference was detected between the locations of Arvand, Zangi and Samayeli ($p < 0.05$). The mean RT was below 90 minutes in all sampling sites. Values of mean RT of the dye ranged from 34 (for the blood samples of mudskipper collected from Jafari site) to 78 minutes (for the blood samples of mudskipper collected from Bahrakan site). Spatial evaluation revealed the longest RT in fish from Bahrakan as compared with those from other sites. Preliminary results showed a significant difference ($p < 0.05$) among sampling sites except between Arvand and Zangi ($p > 0.05$). Osmotic fragility curves indicated that erythrocytes collected from mudskippers at Jafari were the most

fragile followed by Zangi> Arvand> Samayeli> and Bahrakan. The mean erythrocyte fragility was significantly higher at Jafari site ($p < 0.05$) when compared to other sites. Significant differences were found between the various sites ($p < 0.05$). The result indicated no significant differences between the control and treatments of mudskipper RBC exposed to field concentrations of PAHs ($P > 0.05$). The results further indicated significant differences ($P < 0.05$) between the control and treatments of mudskipper RBC exposed to acute Potency Divisor concentrations. It is clear from the present result that chronic Potency Divisor concentrations protect red cells against osmotic hemolysis. This study, however, showed that PAH concentrations in this region are not higher than the available standards. The findings showed that Lysosomal membrane destabilization, liver GST activities and fragility of red cell membrane are highly sensitive in the mudskipper, *B. dussumieri*. Thus, mudskipper perceived to be good sentinel organisms for PAH pollution monitoring. Sediment PAH concentrations were strongly correlated with biomarkers, indicating that PAH-type pollutants were biologically available to fish. One of the possible risk assessment implications of this study is that biomarkers can be applied not only to characterize biological effects of pollution exposures, but also to determine the bioavailability of pollution in aquatic systems. The results also indicated that PAHs compound possess anti haemolytic property.



**ISLAMIC AZAD UNIVERSITY
SCIENCE AND RESEARCH BRANCH**

**Faculty of Marine Science and Technology
Department of marine biology**

Ph.D thesis of Marine Biology

Subject

Biogeochemical study of Poly Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and its physiological affection response in Mudskipper (*B. dussumieri*) at coast of khuzestan

Thesis Advisor

P. Eghtesadi Araghi **Ph.D**
A. Mashinchian **Ph.D**

Consulting Advisor:

M. R. Fatemi **Ph.D**
G. Riazi **Ph.D**

By:

Mahmood Sinaei

Summer 2013